

Санкт-Петербургский государственный университет

Симарева Анастасия Дмитриевна

Изучение взаимосвязи активного деметилирования и фрагментации
ДНК в клетках сперматогенного ряда при нарушениях
сперматогенеза у человека

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена в лаборатории
пренатальной диагностики врожденных
и наследственных заболеваний человека
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта»
(зав. лаб. – д.м.н., проф., з.д.н.,
член-корр. РАН Баранов В.С.)

Научный руководитель:
д.б.н. Даев Евгений Владиславович

Научный консультант:
к.б.н. Пендина Анна Андреевна

Санкт-Петербург
2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Сперматогенез человека.....	7
1.2. Нарушения сперматогенеза, приводящие к бесплодию	11
1.3. Метилирование/деметилирование ДНК как основной способ репрограммирования генома.....	13
1.4. Влияние внешней среды на активность и целостность генома половых клеток.....	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	24
2.1. Материал.....	24
2.2. Методы.....	24
2.2.1. Методика приготовления препаратов из биоптата тканей семенника	24
2.2.2. Обработка препаратов биоптатов семенников методом TUNEL	24
2.2.3. Флуоресцентная гибридизация in situ на препаратах из биоптатов семенников.....	25
2.2.4. Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов из биоптатов семенников с помощью антител к 5hmC	26
2.2.5. Методика приготовления препаратов сперматозоидов из эякулята человека	26
2.2.6. Обработка препаратов эякулята методом TUNEL.....	27
2.2.7. Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов из эякулятов с помощью антител к 5hmC.....	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	29
3.1. Анализ взаимосвязи фрагментации и гидроксиметилирования ДНК в ядрах клеток сперматогенного ряда человека.....	29
3.2. Анализ взаимосвязи фрагментации и гидроксиметилирования ДНК в эякулированных сперматозоидах	34
3.3. Сопоставление доли сперматозоидов, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, и параметров спермограммы.....	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	40
ВЫВОДЫ.....	41

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	42
-------------------------------	-----------

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5caC – 5-карбоксилцитозин

5fC – 5-формилцитозин

5hmC – 5-гидроксиметилцитозин

5mC – 5-метилцитозин

AID – Activation-induced deaminase

АРОБЕС – Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex

AZF – Azoospermia factor

BER – Base-excision repair

BMP – Bone morphogenetic protein

CpG-динуклеотид – динуклеотид, состоящий из цитозина и гуанина, соединенных посредством фосфодиэфирной связи

DAPI – 4,6-диамино-2-фенилиндо

DNMT – ДНК метилтрансфераза

FISH – флуоресцентная гибридизация in situ

MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза

SMUG – Single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase

TdT – Terminal deoxynucleotidil transferase

TET – диоксигеназа (Ten-Eleven-Translocation)

TUNEL – Terminal deoxynucleotidil transferase (TdT) – mediated dUTP Nick and Labelling

АФК – активные формы кислорода

ППК – первичные половые клетки

пре-ППК – предшественники первичных половых клеток

ПХБ – полихлорированные дифенилы

ВВЕДЕНИЕ

Бесплодие в настоящее время является большой социальной проблемой. В половине случаев бесплодным в паре является мужчина. Нарушение сперматогенеза у мужчины может иметь генетическую природу. Однако во многих случаях нарушения не затрагивают последовательность ДНК.

Завершающие этапы сперматогенеза являются крайне чувствительными к действию факторов внешней среды. Во время созревания сперматозоида удаляется большая часть цитоплазмы, что делает клетку чувствительной к действию факторов внешней среды, а также происходит сверхконденсация ДНК, что делает геном сперматозоида не активным, и вся последующая функциональная активность сперматозоидов будет зависеть от запасенных протеинов и РНК. Сперматозоид с поврежденной ДНК может быть способен к оплодотворению, однако образовавшийся эмбрион будет иметь сниженный потенциал к дроблению и последующему развитию. Факторы внешней среды могут влиять как на структуру ДНК, так и на ее эпигенетические модификации.

Эпигенетика изучает изменения экспрессии генов, которые происходят без изменений в структуре ДНК. Основной эпигенетической модификацией является метилирование ДНК. Метилирование ДНК заключается в присоединение метильной группы к цитозину в CpG-динуклеотидах с образованием 5-метилцитозина (5mC). Метилированные CpG-динуклеотиды являются химически стабильными, однако рисунок метилирования может меняться в течение жизни индивидуума (Richards, 2018).

Обратный процесс – деметилирование ДНК – на некоторых этапах развития организма является запрограммированным процессом. В частности, высокий уровень кислородсодержащих производных 5mC в сперматогониях типа А является именно генетически запрограммированным процессом, являющимся одним из этапов репрограммирования генома половых клеток. Однако активное деметилирование может происходить и спонтанно в ответ на влияние факторов внешней среды, приводя к нарушениям в работе генома. Одной из причин спонтанного гидроксиметилирования является избыточное количество активных форм кислорода (АФК) при оксидативном стрессе.

Оксидативный стресс также приводит к появлению разрывов в ДНК и, как следствие, к ее фрагментации. Наиболее уязвимыми к окислительному воздействию АФК являются сперматозоиды. Повреждения ДНК сперматозоидов, как и потеря метильных групп, могут приводить к бесплодию или нарушениям в развитии зародыша вплоть до его

летального исхода. Именно поэтому изучение данного вопроса является крайне важным в настоящее время.

Возможно, что в сперматозоидах процесс гидроксиметилирования и фрагментации ДНК являются спонтанными и опосредованы действием АФК. Напротив, в клетках сперматогенного ряда – сперматогониях и сперматидях, оба процесса являются элементами нормальных процессов, происходящих в семенниках: гидроксиметилирование происходит в рамках запрограммированного активного деметилирования, а ДНК фрагментируется при апоптозе клеток.

Таким образом, целью настоящей работы является анализ взаимосвязи процессов гидроксиметилирования и фрагментации ДНК в клетках сперматогенного ряда человека при нарушениях фертильности

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Оптимизировать метод приготовления препаратов из биоптатов семенников для выявления разрывов в ДНК методом TUNEL
- Оценить долю ядер, содержащих 5-гидроксиметилцитозин и фрагментированную ДНК, в сперматогониях из биоптатов семенников пациентов с азооспермией
- Оценить долю сперматид, содержащих 5-гидроксиметилцитозин и фрагментированную ДНК, в биоптатах семенников пациентов с азооспермией
- Выявить долю сперматозоидов в эякуляте, содержащих одновременно фрагментированную ДНК и 5-гидроксиметилцитозин, у пациентов с нарушениями фертильности
- Проанализировать взаимосвязь между параметрами спермограммы и долей клеток, в которых одновременно выявлена фрагментированная ДНК и 5-гидроксиметилцитозин

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1 Сперматогенез человека.

Сперматогенез – процесс, в ходе которого из диплоидных клеток – сперматогониев, образуются гаплоидные высокоспециализированные клетки – сперматозоиды.

У млекопитающих сперматогенез происходит в мужских половых органах – семенниках. Функциональной единицей семенника являются извитые семенные канальца. Они занимают 2/3 самого органа. Семенные канальца состоят из базальной мембраны, клеток Сертоли и половых клеток на различных стадиях созревания. На сегодняшний день выделяют 6 типов половых клеток: (в порядке созревания) сперматогонии типа A-dark, сперматогонии типа A-pale, сперматогонии типа В, сперматоциты первого порядка, сперматоциты второго порядка, сперматиды и сперматозоиды.

Клетки Сертоли незаменимы для нормального течения сперматогенеза и занимают 35-40% эпителия семенных канальцев взрослого человека (Russell et al., 1990). Они обладают неправильной формой и линейной поляризацией. Основание клетки Сертоли располагается на базальной мембране, а апикальная часть выглядывает в просвет семенного канальца. Морфология клеток постоянно меняется, образуются большие цитоплазматические выросты, напоминающие ветви деревьев. В карманах, образованных этими выростами, находятся половые клетки. Клетки Сертоли направляют половые клетки к просвету канальца по мере их развития. Одна клетка Сертоли способна поддерживать до 30-50 половых клеток на разных стадиях развития.

Продукция сперматозоидов зависит от клеток Сертоли. Число половых клеток на одну клетку Сертоли остается неизменным в любом возрасте (Amann, 2008). Хотя количество самих клеток Сертоли уменьшается с возрастом (Johnson, Petty, Neaves, 1986).

Клетки Сертоли также могут функционировать как макрофаги. С помощью фагоцитоза удаляются все неправильно развивающиеся половые клетки и резидуальные тельца из сперматид. Это функция очень важна, т.к. значительная часть половых клеток погибает в ходе развития, а присутствие таких мертвых клеток в семенном канальце могло бы иметь негативное влияние на сперматогенез (Nakagawa et al, 2005).

Благодаря тесным контактам между собой клетки Сертоли способны формировать гематотестикулярный барьер. Из-за высокой иммуногенности половые клетки должны быть изолированы от иммунокомпетентных клеток. Гематотестикулярный барьер – это анатомический и функциональный барьер, который делит семенной эпителий на 2 части –

базальный и апикальный отделы. Он предотвращает параклеточный транспорт веществ и защищает клетки сперматогенного ряда от действия иммунной системы (Cheng, Mruk, 2012).

Между соседними семенными канальцами в рыхлой соединительной ткани находятся клетки Лейдига. Основным продуктом клеток Лейдига является тестостерон. Они секретируют 3-10 мг тестостерона в день. Этот мужской половой гормон способен инициировать рост и деление сперматогониев. Клетки Лейдига также являются основным источником эстрогенов, в частности, эстрадиола, который синтезируется из тестостерона.

Сперматогенез - это совокупность 4 последовательных процессов:

1. Проплиферация и дифференцировка сперматогониев включает в себя поддержание популяции сперматогониев типов A-dark и A-pale, деление сперматогониев типа A-pale с образованием сперматогониев типа B и деление последних с формированием сперматоцитов.

2. Мейоз сперматоцитов включает в себя синтез ДНК в сперматоцитах на стадии прелептотены и 2 мейотических деления с образованием сперматид.

3. Спермиогенез – это трансформация сферических сперматид в сперматозоиды.

4. Спермация – это разрыв связей заякоренных зрелых сперматозоидов с клетками Сертоли, в ходе чего они выпускаются в просвет семенного канальца. Каждую минуту в просвет канальца выпускается примерно 25 тысяч сперматозоидов (Amann, 2008).

Предшественниками гамет млекопитающих являются первичные половые клетки (ППК). ППК и их предшественники формируются на ранних этапах эмбриогенеза в проксимальной части эпибласта. Образование предшественников ППК из клеток эпибласта зависит от сигналов, вырабатываемых окружающей экстраэмбриональной эктодермой и висцеральной энтодермой развивающегося эмбриона (Ohinata et al., 2009; Aramaki et al., 2013). Основную роль играют белки BMP (bone morphogenetic protein). Активность белков BMP4 и BMP8b, вырабатываемых экстраэмбриональной эктодермой, и BMP2, выделяемого висцеральной энтодермой, вызывает дифференцировку предшественников ППК за счет активации в них генов *Blimp1*, *Smad1*, *Smad4* и *Smad5* (Ohinata et al., 2009; Aramaki et al., 2013; Tremblay et al., 2001; Chu et al., 2004, Chang, Matzuk, 2001). Белок BLIMP1 является одним из ключевых регуляторов дифференцировки ППК (Ohinata et al., 2005). Предшественники ППК экспрессируют факторы соматических клеток – NOXA1, NOXB1 и другие. Белок BLIMP1 участвует в репрессии активности этих соматических генов и, таким образом, поддерживает процесс дифференцировки ППК (Tang et al., 2016). Помимо этого, ППК экспрессируют гены плюрипотентности, такие как

Oct4, *Sox2* и *Nanog*, необходимые для развития ППК (Kehler et al., 2004; Campolo et al., 2013; Chambers et al., 2007).

После дифференцировки ППК начинают активную миграцию в область зачатка гонад (Kumar, DeFalco, 2017). Вскоре после миграции ППК подвергаются морфологическим изменениям, таким как потеря поляризации и подвижности, и дифференцируются в гоноциты, которые продолжают пролиферировать. После рождения гоноциты дифференцируются в сперматогонии, которые будут находиться в покое до полового созревания.

Сперматогонии – это диплоидные предшественники всех половых клеток. Сперматогонии делятся митозом для поддержания популяции и мейозом для формирования мужских половых гамет. Они расположены в базальной части семенного канальца в близком контакте с клетками Сертоли (Рис. 1). Сперматогонии обладают овальным ядром и плотной цитоплазмой с небольшим аппаратом Гольджи, несколькими митохондриями и многочисленными рибосомами. Сперматогонии делятся на 3 типа: A-pale (Ap), A-dark (Ad) и B (Clermont, 1966).

Стволовыми клетками являются сперматогонии типа A. Сперматогонии типа Ad пролиферируют, поддерживая свою популяцию, и образуют сперматогонии типа Ap. Сперматогонии типа Ap пролиферируют, поддерживая популяцию клеток, а также продуцируют сперматогонии типа B.

Сперматоциты первого порядка являются продуктами митотического деления сперматогониев типа B. Это первые половые клетки, которые пересекают гематотестикулярный барьер, где они становятся иммунологически изолированными и способными к мейозу. Сперматоциты первого порядка классифицируются по стадиям профазы I (Clermont, 1963).

После первого деления мейоза формируются 2 сперматоцита второго порядка. В результате второго деления образуются 4 гаплоидные сперматиды.

Спермиогенез – это процесс, в ходе которого 1 круглый сперматид становится сперматозоидом. На этой стадии не происходит никаких делений, но происходят серии цитоплазматических и ядерных изменений. Из мембран аппарата Гольджи с участием цитоскелетных структур формируется акросома, содержащая литические ферменты для будущего проникновения в ядерную оболочку яйцеклетки (Oko, Sutovsky, 2009). Ядро становится более конденсированным и мигрирует к периферии. Протамины заменяют большую часть ядерных гистонов, что приводит к еще большей конденсации ДНК (Biermann, Steger, 2007). ДНК становится транскрипционно неактивной, а весь

протеиновый синтез с этого момента зависит от запасенных РНК. Вырастает жгутик. Митохондрии увеличиваются в количестве и собираются вокруг основания жгутика, формируя его шейку. С целью максимизации подвижности сперматозоидов излишки цитоплазмы, содержащие остатки аппарата Гольджи и другие органеллы, удаляются, формируя резидуальные тельца, которые затем будут поглощены фагоцитозом клетками Сертоли.

Как только сперматиды полностью трансформируются, они отделяются от клетки Сертоли и попадают в просвет канальца в процессе, называемом спермацией. В придатке яичка сперматозоиды дозревают и приобретают подвижность.

Во время своего развития половые клетки, произошедшие от одного сперматогония, связаны цитоплазматическими мостиками, что позволяет синхронизировать развитие клеток в клеточной ассоциации (Amann, 2008).

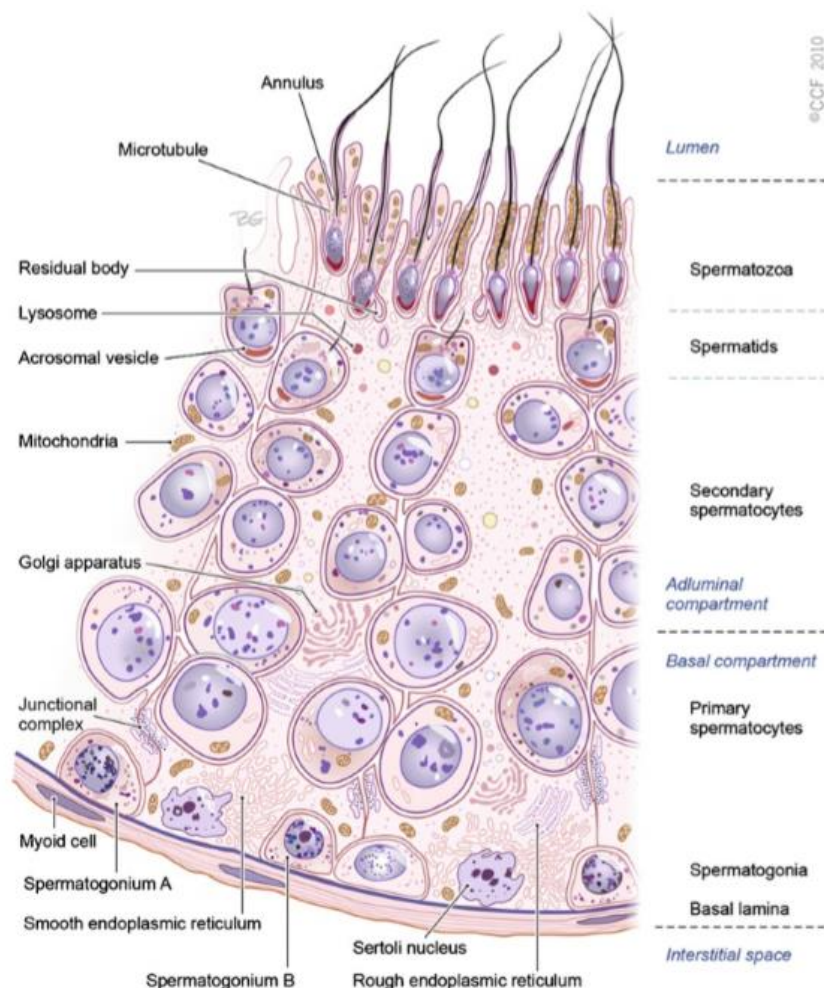


Рис. 1. Участок стенки семенного канальца. Клетки Сертоли делят стенки канальца на базальный и апикальный компартменты. Сперматозоиды выходят в просвет канальца (по Sharma, Agarwal, 2011).

У человека весь сперматогенез, от пролиферации сперматогониев типа Ар до спермиации, занимает в среднем 74 дня.

Таким образом, сперматогенез – это сложный процесс, включающий в себя митоз, мейоз и трансформацию клеток. Правильное прохождение всех стадий сперматогенеза обеспечивает репродуктивный успех у мужчины.

1.2 Нарушения сперматогенеза, приводящие к бесплодию.

Бесплодие – одна из самых серьезных социальных проблем в настоящее время. Бесплодием страдают примерно 15% пар, которые хотели бы иметь детей, и в половине случаев репродуктивная функция нарушена у мужчин (Agarwal et al., 2015). Частота мужского бесплодия в разных странах варьирует от 2,5% до 12% (Agarwal et al., 2015).

Традиционный анализ спермограммы, использующийся для диагностики мужского бесплодия, включает в себя концентрацию спермы, ее подвижность и морфологию сперматозоидов. В последнее время также в качестве критерия для оценки мужской фертильности используют уровень фрагментации ДНК.

Пониженная мужская репродуктивная способность может быть опосредована конгенитальными заболеваниями, урогенитальными инфекциями или травмами, варикоцеле, эндокринными нарушениями, а также другими генетическими или иммунологическими факторами.

Примерно 40% бесплодных мужчин страдают варикоцеле (Pathak et al., 2016). Варикоцеле – это заболевание мужских половых трактов, характеризующееся извилистостью и дилатацией вен семенного канатика. Это заболевание способно приводить к увеличению количества АФК и вызывать оксидативный стресс, приводящий к нарушениям репродуктивной функции (Heidari et al., 2016).

Эпигенетические модификации, такие как нарушения характера метилирования ДНК, могут также вызвать бесплодие у мужчины. Аберрантный рисунок эпигенетических модификаций в мужских половых клетках может привести к нарушениям функций сперматозоида (Dada et al., 2012), или к нарушениям развития зародыша.

Основными описательными диагнозами являются олигозооспермия (сниженная концентрация сперматозоидов в эякуляте), астенозооспермия (сниженная подвижность сперматозоидов), тератозооспермия (нарушение морфологии сперматозоидов). Возможны и комбинации диагнозов, например, олигоастенотератозооспермия (Tuttelmann et al., 2018).

Однако самой тяжелой с клинической точки зрения является азооспермия. Азооспермия характеризуется отсутствием сперматозоидов в эякуляте. Азооспермией страдают ~10% мужчин, страдающих бесплодием (Tuttelmann et al., 2011).

Азооспермия включает в себя два типа: необструктивная и обструктивная. В случае необструктивной азооспермии нарушен процесс сперматогенеза, и сперматозоиды не образуются. При обструктивной азооспермии сперматогенез идет до конца, но нарушена целостность семявыносящих протоков и сперматозоиды не попадают в эякулят.

Одним из примеров необструктивной азооспермии является синдром Sertoli-cell-only (SCO). SCO является последствием нарушений сперматогенеза на начальных этапах и характеризуется отсутствием, полным или частичным, сперматогониев и всех дальнейших клеток сперматогенного ряда. Возможна остановка сперматогенеза и на других стадиях. Также азооспермия может быть как глобальной, характеризующейся нарушениями во всех канальцах, так и локальной.

Причинами необструктивной азооспермии могут быть генетические аномалии, делеции и мутации в Y-хромосоме. Микроделеции в Y-хромосоме являются одним из самых часто встречающихся причин бесплодия (de Sousa Filho et al., 2017), способных приводить к азооспермии или тяжелой олигозооспермии (Dai et al., 2015). Один из самых изучаемых регионов Y-хромосомы, связанных с мужским бесплодием, является регион факторов азооспермии – AZF. На данный момент известно 3 гена, находящихся в Y-хромосоме в регионе AZF, мутации в которых обуславливают развитие азооспермии: *DAZ*, *RBM1Y*, *USP9Y* (Miyamoto et al., 2017). Также были найдены и аутосомальные гены, отвечающие за мужскую фертильность. В частности, гены *SYCP3* хромосомы 12 и *HSF2* хромосомы 6 (Mou et al., 2013). Причиной азооспермии и блока мейоза также могут быть мутации в гене *TEX11*, находящимся на X-хромосоме (Yatsenko et al., 2015). У ~1% мужчин, страдающих азооспермией, были обнаружены мутации в гене *TEX11* (Yang et al., 2015). Недавно были открыты 3 новых гена, мутации в которых приводят к азооспермии: *MEIOB*, *TEX14* и *DNAH6* (Gershoni et al., 2017). Каждый из этих генов ассоциирован с различными стадиями сперматогенеза, что еще раз демонстрирует многообразие причин азооспермии.

Причиной обструктивной азооспермии, чаще всего, являются мутации в гене *CFTR*, что приводит к преждевременной остановке развития семявыносящих канальцев и их отсутствию. Также в недавних исследованиях были описаны мутации в гене *ADGRG2*, которые приводили к схожему фенотипу (Patat et al., 2016).

1.3 Метилирование/деметилирование ДНК как основной способ репрограммирования генома

Разные типы клеток, не похожие по функциям и морфологии друг на друга, дифференцируются из потомков одной плюрипотентной клетки (зиготы). Их дифференциация, основанная на практически идентичном генетическом материале, опосредована эпигенетическими модификациями. Каждая ткань организма обладает своим рисунком модификаций структуры хроматина, который сохраняется в ряду делений клетки. Наличие химических групп у определенных элементов генома может приводить как к индуцированию экспрессии генов, так и к ее блокированию.

Одной из основных эпигенетических модификаций, регулирующих экспрессию генов в геноме млекопитающих, является метилирование ДНК. Метилирование ДНК заключается в переносе метильной группы ($-\text{CH}_3$) на углерод в 5 положении цитозина в составе CpG-динуклеотида с образованием 5-метилцитозина (Nakao, 2001). Донором метильной группы является S-аденозилметионин (Crider et al., 2012). По современным данным геном человека содержит приблизительно 3×10^7 CpG-динуклеотидов (Edwards et al., 2017), из них приблизительно 60-90% несут метильную группу (Richards et al., 2018). Содержание CpG-динуклеотидов в разных районах генома различно. Районы с высокой концентрацией CpG-динуклеотидов называются CpG-островками и часто связаны с регуляторными районами генов. 75% промоторов содержат CpG-островки и большинство промоторов находятся в неметилированном состоянии, тогда как остальные промоторы содержат невысокое количество CpG-динуклеотидов и их регулирование с помощью метилирования является крайне сомнительным (Bestor et al., 2015). Также есть CpG-островки, которые не связаны с промоторами или другими регуляторными последовательностями. Их биологическая значимость, возможно, несущественна (Edwards et al., 2017). Изучение эмбриональных стволовых клеток человека показало, что 5,83% цитозинов являются метилированными, 82,7% CpG-динуклеотидов несут метильную группу и 25% метилированных цитозинов приходится не на CpG-сайты (Lister et al., 2009). Интересно отметить, что в недавних исследованиях было обнаружено, что у млекопитающих, помимо метилирования цитозина, может также происходить метилирование аденина (Wu et al., 2016).

Метилирование CpG-островков, колокализованных с промоторами или регуляторными областями, связано чаще всего с репрессией активности гена. Однако

метилирование последовательностей ДНК не всегда приводит к сайленсингу генов. Было показано, что ген теломеразы активируется в метилированном состоянии (Guilleret et al., 2002).

Метилирование ДНК происходит за счет действия ферментов ДНК-метилтрансфераз: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L. ДНК-метилтрансфераза сканирует последовательность нуклеотидов ДНК в поисках сайта узнавания. Она связывается с цитозином в сайте узнавания, формируется комплекс, в котором происходит реакция метилирования, и уже метилированная ДНК высвобождается из комплекса (Utsumi et al., 2018).

DNMT1 является поддерживающей метилтрансферазой. Это основной фермент, отвечающий за метилирование новосинтезированной цепочки ДНК по образцу материнской. DNMT1 играет важную роль в сохранении специфичного рисунка метилирования ДНК в ряду поколений. Наиболее интенсивная экспрессия генов *Dnmt1* происходит в активно делящихся клетках. DNMT1 содержит С-концевой каталитический домен, сходный по структуре и последовательности с таковыми у других ДНК-метилтрансфераз, и большой N-концевой район, содержащий несколько функциональных доменов (Edwards et al., 2017). DNMT1 обладает аутоингибиторным механизмом, обеспечивающим взаимодействие только с гемиметилированной ДНК. СХХС-домен способен связываться с неметилированными CpG-динуклеотидами и вставлять ряд аминокислот между ДНК и активным сайтом белка, таким образом ингибируя метилирование *de novo* (Song et al, 2011).

DNMT3A и DNMT3B устанавливают рисунок метилирования ДНК *de novo*. Эти ферменты необходимы в репрограммировании генома в раннем эмбриогенезе и гаметогенезе для установления нового рисунка метилирования. Они также способны изменять уровень метилирования ДНК в уже дифференцированных соматических клетках. Важно отметить, что DNMT3A и DNMT3B метилируют разные последовательности ДНК генома.

DNMT3L не содержит доменов, необходимых для метилазной активности, но способен взаимодействовать с DNMT3A и DNMT3B. Было показано, что DNMT3L способен формировать комплекс с DNMT3A и DNMT3B и связывать его с последовательностями ДНК, ассоциированными с гистонами, которые не метилированы по 4 лизину гистона H3 (Ooi et al., 2007; Nimura et al., 2006).

DNMT2 не способна метилировать ДНК, и, в отличие от DNMT1 и DNMT3, имеет цитоплазматическую локализацию. Функцией DNMT2 является метилирование тРНК аспарагина (Goll et al., 2006).

ДНК-метилтрансферазы экспрессируются на всем протяжении сперматогенеза человека во время мейоза, клеточного деления, дифференциации сперматид и в зрелых эякулированных сперматозоидах (Marques et al., 2011).

Метилирование ДНК является основным механизмом инактивации транспозонов, моноаллельной экспрессии импринтированных генов у млекопитающих, инактивации X-хромосомы в женских клетках (Edwards et al., 2017).

Обратный процесс – деметилирование ДНК – может происходить пассивно и активно. В ходе пассивного деметилирования ДНК не происходит полное метилирование новосинтезированной цепочки ДНК по образцу старой в ходе последовательных циклов репликации. Таким образом, в дочерней цепи теряются метильные группы у числа цитозинов. Новый измененный рисунок будет наследоваться в ряду поколений, так как именно с него будут метилироваться последующие дочерние цепи ДНК.

В ходе активного деметилирования метильная группа удаляется с цитозина вне репликационного цикла. Активное деметилирование может происходить с помощью нескольких биохимических процессов. Основной путь активного деметилирования – ТЕТ-опосредованное окисление 5-метилцитозина. Продуктом окисления 5-метилцитозина является 5-гидроксиметилцитозин, который, в свою очередь, окисляется до 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2011). Затем 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин вырезается, и апириимидиновый сайт репарируется вставкой цитозина (He et al., 2011). Каждый этап последовательного окисления 5-метилцитозина катализируется белками семейства ТЕТ – ТЕТ1, ТЕТ2 и ТЕТ3 (Рис. 2).

Активное деметилирование может пойти и по другому пути. Активность ферментов семейств AID/APOBEC приводят к дезаминированию 5-гидроксиметилцитозина с образованием 5-гидроксиметилурацила. При действии TDG/SMUG глюкозилаз осуществиться репарация с восстановлением цитозина. Кроме того, 5-метилцитозин в реакции дезаминирования может превращаться в тимин, который в дальнейшем будет также репарирован с вставкой цитозина.

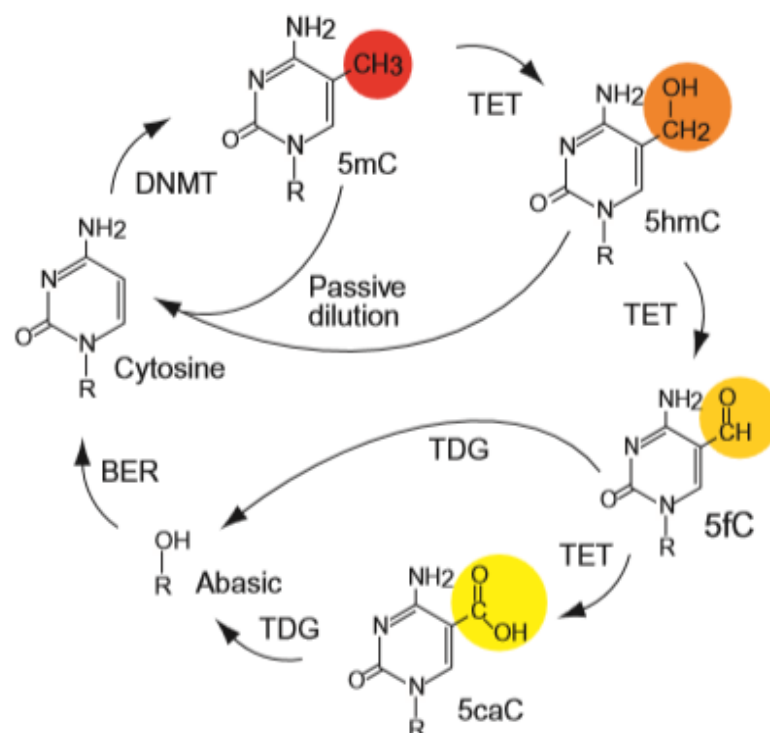


Рис. 2. Основные пути метилирования и деметилирования ДНК. Метильная группа присоединяется к пятому углероду цитозина в составе CpG-динуклеотида с формированием 5mC. За перенос метильных групп отвечают ДНК-метилтрансферазы. Метильная группа может быть удалена пассивно в ряду делений или окислена с помощью TET-белков с образованием 5hmC. 5hmC может быть удален пассивно или в результате окисления с помощью TET-белков с образованием 5fC и 5caC. 5fC и 5caC удаляются и на это место вставляется цитозин с помощью BER-репарации (по Seah, Messerschmidt, 2017).

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов является важным элементом дифференцировки половых клеток во время сперматогенеза. Нарушения механизмов эпигенетического репрограммирования генома может привести к мужскому бесплодию. Эпигенетические события влияют на такие важные процессы по ходу сперматогенеза как конденсация хроматина, формирование XY-телец, сайленсинг ретротранспозонов, импринтинг генов, некоторые этапы мейоза и упаковка ДНК в ядрах сперматозоидов.

Эпигенетические модификации являются существенным событием для некоторых этапов упаковки мейотических хромосом, их спаривания и рекомбинации. ДНК-метилтрансфераза DNMT3L вовлечена в процесс метилирования в мужских половых клетках во время мейоза. В ее отсутствии мейотические хромосомы становятся не способными формировать гетерохроматин и спариваться на стадии зиготены. На стадии лептотены и зиготены сперматоциты формировали негомологичные синапсы и были не

способны достигать стадию пахитены. Как следствие, все половые клетки в результате погибали вследствие апоптоза (Bourc'his, Bestor, 2004). Считается, что у мужчин с мутацией в *Dnmt3l* недостаток метилирования ДНК проявляется в неподходящем эухроматическом состоянии генома во время мейоза, а гены, которые должны были бы быть репрессированы, включая импринтированные гены и ретротранспозоны, остаются активными, что приводит к так называемой мейотической катастрофе (Bourc'his, Bestor, 2004). DNMT3L-опосредованное метилирование необходимо для клеток, вступающих в мейоз, для нормального течения сперматогенеза.

Мужские и женские гаметы у млекопитающих берут начало от эмбриональных клеток, несущих определенный набор эпигенетических модификаций. Как следствие, эти эпигенетические маркеры должны быть удалены во время дифференцировки половых клеток, и установлены новые с целью поддержания возобновления тотипотентности в каждом новом поколении (Smallwood, Kelsey, 2012). Этот процесс называется эпигенетическим репрограммированием генома (Рис. 3). Он включает в себя глобальное деметилирование ДНК, ремоделирование хроматина, пространственную реорганизацию генома и транскрипционные изменения (Eckersley-Maslin et al., 2018).

Первая волна репрограммирования генома связана с развитием первичных половых клеток. ППК берут начало от эмбриональных клеток, которые уже встали на соматический путь и приобрели специфический гиперметилированный рисунок ДНК (Smallwood, Kelsey, 2012). Поэтому очень важно, что во время своей пролиферации и миграции к зачатку гонады ППК подвергаются практически полному деметилированию генома (Рис. 3, черная линия). Деметилирование ДНК происходит, в основном, за счет инактивации поддерживающей системы метилирования, но может происходить и за счет активного метилирования (Kagiwada et al., 2013; Ohno et al., 2013). Уровень метилирования ДНК у мышей снижается от 70%, наблюдаемых у соматических клеток, до 10% (Popp et al., 2010).

Установление рисунка метилирования в мужских и женских половых клетках происходит в разное время (Рис. 3, синяя и красная линии). Новый паттерн метилирования в женских половых клетках появляется во время оогенеза в постнатальный период развития (Bourc'his et al., 2001). De novo метилирование происходит в ооцитах, чье развитие останавливается на стадии профазы I. В пубертатном возрасте под влиянием специфических эндокринных сигналов ооциты заканчивают первое мейотическое деление. После отделения первого полярного тела ооциты останавливаются на метафазе II, и деление продолжается только после оплодотворения. У мужчин новый рисунок

метилирования ДНК начинает закладываться до рождения в просперматогониях и заканчивается еще до рождения.

Высокоспециализированные геномы родительских гамет, несущие по-разному распределенные эпигенетические метки, при оплодотворении запускают вторую волну репрограммирования, что приводит к образованию тотипотентной зиготы. Конденсированное ядро сперматозоида с протаминовым хроматином должно быстро реорганизоваться, заменив обратно протамины на гистоны. Практически одновременно с деконденсацией ядра сперматозоида происходит и активное деметилирование его генома при участии, вероятнее всего, белков ТЕТ-семейства (McLay, Clarke, 2003; Gu et al., 2011; Wang et al., 2014). Материнский же геном деметилируется пассивно, за счет потери метильных групп во время репликации. Важно отметить, что в некоторых исследованиях было обнаружено значительное количество 5hmC и 5fC в женском пронуклеусе, что предполагает возможное активное деметилирование и в женском геноме (Wang et al., 2014). Однако не весь геном подвергается удалению метильных групп. Некоторые импринтированные гены и транспозоны сохраняют свой набор эпигенетических модификаций на всех стадиях развития клетки.

По мере развития зиготы происходит переключение с материнского генома на зиготический. Этот переход заключается в истощении запасов материнских РНК и протеинов и активации транскрипции генома зиготы (Li et al., 2013; Eckersley-Maslin et al., 2018).

Деметилирование продолжается вплоть до стадии бластоцисты, состоящей уже из плюрипотентных клеток (Chazaud, Yamanaka, 2016). Восстановление рисунка метилирования происходит *de novo* во время гастрюляции (Lee et al., 2014; Hackett, Surani, 2013). Переход из стадии деметилированной ДНК в метилированную ДНК характеризуется снижением уровня белков ТЕТ1/2 и повышением уровня ДНК-метилтрансфераз DNMT3A/B, а затем и DNMT1 (Oda et al., 2013). Внутренняя клеточная масса, которая вскоре даст начало всем видам тканей будущего организма, гиперметируется по сравнению с трофобластической оболочкой, формирующей плаценту и внеэмбриональные ткани.

Среди соматических тканей, берущих начало от внутренней клеточной массы, находятся высокометилованные ППК, популяция которых вскоре начинает миграцию к зачатку гонаду, где они дифференцируются в зрелые половые клетки, завершая цикл.

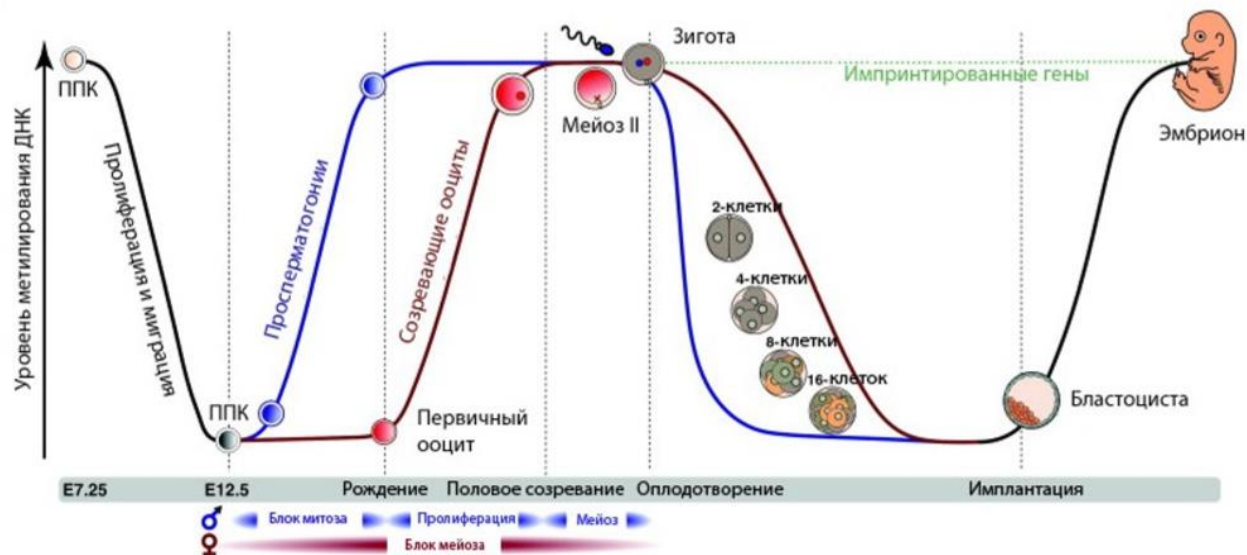


Рис. 3. Изменение уровня метилирования ДНК во время развития организма.

В зиготе метильные метки на отцовском геноме удаляются с помощью активного деметилирования (синяя линия). Деметилирование материнского генома происходит медленнее (красная линия) за счет пассивного деметилирования. Однако волна деметилирования не затрагивает импринтированные гены (зеленая пунктирная линия). Во время дальнейшего развития зиготы и клеточной детерминации происходит установление нового рисунка метилирования ДНК (по Smallwood, Kelsey, 2012).

1.4 Влияние внешней среды на активность и целостность генома половых клеток

Известно, что окружающая среда может повлиять на эпигенетическую регуляцию клетки. Нарушение эпигенетической регуляции может привести к частичному или полному бесплодию у мужчин. На данный момент есть много работ, исследующих способность определенных факторов внешней среды вызывать aberrантный эпигенетический рисунок и негативно влиять на репродуктивный потенциал мужчины.

В последнее время, все больше и больше внимания ученых уделяется влиянию активных форм кислорода (АФК) на репродуктивные функции человека. АФК — это высоко реактивные окислительные молекулы, относящиеся к классу свободных радикалов. Примерами свободных радикалов являются супероксид-анион O_2^- , гидропероксил-радикал HO_2^- и гидроксил-радикал OH^- (Aitken, Fisher, 1994). АФК обладают токсичным действием на качество и репродуктивную способность сперматозоидов человека (Saleh, Agarwal, 2002). Оксидативный стресс, вызванный большим количеством АФК, приводит к фрагментации ДНК в клетках сперматогенного

ряда. Свободные радикалы также могут участвовать в реакции спонтанного деметилирования, окисляя 5-метилцитозин до 5-гидроксиметилцитозина. Примерно у половины мужчин, страдающих бесплодием, основной причиной оказывался оксидативный стресс (de Paula et al., 2006). Геном сперматозоидов является очень чувствительным к повреждениям в структуре ДНК в виду отсутствия репаративной системы. С целью уменьшения вероятности подобного повреждения хроматин сверхконденсируется и упаковывается с помощью протаминов.

Источником АФК могут являться митохондрии, так как именно там они активно продуцируются. Митохондрии наиболее чувствительны к оксидативному стрессу также из-за того, что митохондриальная ДНК не защищена гистонами. Таким образом, продукция АФК повреждает геном клетки, что в свою очередь может привести к повреждению работы митохондриальной дыхательной цепи и продукции еще большего количества АФК (Pasqualotto, Pasqualotto, 2011).

АФК в малых дозах необходимы для нормального хода некоторых этапов сперматогенеза. Контроль над концентрацией АФК осуществляется антиоксидантами. Так как в процессе компактизации и удаления большей части цитоплазмы при созревании сперматозоидов удаляется также и репаративная система, единственным механизмом борьбы с АФК являются антиоксиданты. Семенная жидкость в норме содержит супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу, каталазы, а также аскорбаты и α -токоферол. Все они обладают антиоксидатными свойствами. Прием антиоксидантов пациентами, страдающими от бесплодия, повышает вероятность репродуктивного успеха (Comhaire et al., 2000). Таким образом, правильно подобранная терапия увеличивает шанс репродуктивного успеха.

Также недавно было показано, что витамин С (аскорбиновая кислота) способен регулировать работу ТЕТ-белков, отвечающих за продукцию 5-гидроксиметилцитозина и деметилирования ДНК (Blaschke et al., 2013).

Большую роль в процессе метилирования ДНК играет цикл фолатов. В ходе этого цикла образуются доноры метильной группы, которые используются для синтеза нуклеотидов, крайне необходимых в активно делящихся клетках, и для реметилирования гомоцистеина с образованием метионина. Метионин, в свою очередь, является основным компонентом донора метильной группы S-аденозилметионина (Crider et al., 2012). В исследованиях на животных было показано, что недостаточный уровень потребления фолиевой кислоты приводит к нарушениям мужской репродуктивной способности, изменениям рисунка эпигенетических модификаций сперматозоидов и негативно влияет

на развитие потомков (Lambrot et al., 2013). При этом было также показано, что прием высоких доз фолиевой кислоты в течение нескольких месяцев приводит к нарушениям в рисунке метилирования ДНК, что обостряется при недостатке метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) – ключевого фермента, вовлеченного в цикл фолиевой кислоты (Aarabi et al., 2015).

Известно, что репродуктивная способность мужчин снижается с возрастом, хотя сперматогенез продолжается до конца жизни (Sloter et al., 2004). С увеличением возраста человека увеличивается частота разрывов в ДНК (Singh et al., 2003). Во многих работах также было показано, что некоторые виды деятельности мужчин пагубно влияют на их репродуктивный потенциал. В частности, у мужчин, занимающихся сжиганием мусора или работающих в индустрии, связанной с инсектицидами и пестицидами, был выявлен повышенный уровень повреждений ДНК в половых клетках (Oh et al., 2005; Bian et al., 2004; Xia et al., 2004).

На геном мужских половых клеток также могут негативно влиять некоторые фармакологические препараты. В частности, химиотерапевтические препараты являются генотоксичными для мужских половых клеток.

Глобальное развитие промышленных технологий привело к повышению содержания токсичных веществ в окружающей среде (Mima et al., 2018). Воздействие химикатов, используемых в промышленных производствах, может привести к серьезным нарушениям репродуктивной системы вплоть до бесплодия или передаваться будущим поколениям (Jenardhanan et al., 2016). Полихлорированные бифенилы (ПХБ) раньше широко использовались как диэлектрические жидкости. ПХБ являются ксеноэстрогенами и крайне устойчивы к деградации, поэтому, несмотря на прекращение их использования, они остаются глобальной проблемой для окружающей среды. Длительное воздействие ПХБ на человека приводит к снижению качества сперматозоидов (Jiang et al., 2017). Бисфенол А широко используется в современной промышленности, в частности он входит в состав бутылочек для детей и пластиковых контейнеров. Воздействие бисфенолом А приводит к нарушениям сперматогенеза, опосредованного, в частности, ингибированием экспрессии рецептора андрогенов (Qiu et al., 2013). Также бисфенол А может стать причиной сниженной продукции сперматозоидов, повреждений акросомы и нарушений работы митохондрий (Wisniewski et al., 2015). В промышленности также широко используются фталаты, необходимые для сохранения цвета и запаха продукта. При этом воздействие некоторых фталатов приводит к снижению качества сперматозоидов,

повышению повреждений в ДНК и апоптозу сперматозоидов (Cai et al., 2015; Wang et al., 2016).

Также загрязнителем окружающей среды являются тяжелые металлы, широко используемые в промышленности. Наиболее опасными для репродуктивной системы являются кадмий, ртуть и свинец. Они могут как непосредственно влиять на репродуктивную систему, так и косвенно. Кадмий влияет на сперматогенез и гормональную систему и способен вызывать токсический эффект даже в низких концентрациях (de Angelis et al., 2017). Некоторые тяжелые металлы способны связываться с рецепторами эстрогенов и андрогенов и, тем самым, снижать концентрацию сперматозоидов и нарушать их подвижность. Тяжелые металлы также могут повышать уровень АФК и приводить к оксидативному стрессу (Rana, 2014). Такие загрязнители окружающей среды как смог также обладают способностью пагубно влиять на структуру ДНК (Evenson, Wixon, 2005).

Локальная повышенная температура также может быть источником повреждений хроматина сперматозоида (Paul et al., 2008). У большинства млекопитающих, в том числе и у человека, тестисы расположены за пределами брюшной полости в мошонке для поддержания температуры, ниже на 2-8°C температуры тела. Такая температура необходима для нормального течения сперматогенеза. Повышение температуры тестисов может привести к тепловому шоку и нарушению их работы. По данным исследования тепловое воздействие может приводить к снижению числа сперматозоидов в эякуляте и их подвижности (Garolla et al., 2013).

Также причиной мужского бесплодия могут являться курение и чрезмерное употребление алкоголя (Rubes et al., 1998). Курение способствует увеличению количества АФК и, как следствие, оксидативному стрессу, таким образом, вызывая повреждения в ДНК.

Повышенный индекс массы тела также может негативно влиять на качество сперматозоидов. Было показано, что у мужчин с ожирением уровень фрагментации ДНК значительно выше, по сравнению с мужчинами нормального веса, при этом объем эякулята меньше, чем у людей без ожирения. Однако в этих же работах было показано, что ожирение не влияет на концентрацию, подвижность и морфологию сперматозоидов (Chavarro et al., 2010).

Небольшое количество повреждений (~8%) в ДНК сперматозоидов может быть репарировано после оплодотворения за счет репаративных систем яйцеклетки. Но при повышенном количестве фрагментированной ДНК этот процесс может оказаться

неполным или даже несущественным. В таком случае, нерепарированная до конца ДНК сперматозоида приведет к снижению жизнеспособности эмбриона вплоть до его летального исхода (Frydman et al., 2008).

Половые клетки – единственные клетки организма, способные передавать генетическую информацию через поколения. Таким образом, сохранность структуры и эпигенетических модификаций ДНК является крайне важным для нормального развития будущих поколений. Так как половые клетки являются крайне чувствительными к действию вредных факторов окружающей среды, загрязнение окружающей среды стало одной из главных проблем современного мира.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Материал

В качестве материала для проведения исследования были использованы образцы биоптата тканей семенников 7 пациентов с диагнозом азооспермия и эякуляты 8 пациентов с нарушением фертильности. Экспериментальный материал и показатели TUNEL предоставлены отделением вспомогательных репродуктивных технологий ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта».

2.2. Методы

2.2.1. Методика приготовления препаратов из биоптата тканей семенника

Образцы биоптатов семенников переносили во флаконы с 5 мл 0,9% цитрата натрия и 125 мкл раствора колхицина с концентрацией 0,1 мг/мл. Гипотоническую обработку материала проводили при комнатной температуре в течение 60-75 минут. Далее из флаконов удаляли 2,5 мл гипотонического раствора и добавляли такой же объем фиксатора (этанол + ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1). Префиксацию проводили при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем из флакона с помощью пипетки удалили весь префиксирующий раствор и сразу же добавили 5 мл фиксатора. Фиксацию проводили при +4°C более 1,5 часов. Далее при помощи пинцета вынимали фрагменты материала, высушивали на фильтровальной бумаге и переносили на чистое предметное стекло. После этого капали 2-3 капли 20%-й уксусной кислоты и проводили мацерацию под визуальным контролем с помощью бинокля МСП-1. Полученную суспензию распределяли по поверхности посредством качения капель по предметному стеклу. Далее на препарат наносили 2-3 капли фиксатора и высушивали при комнатной температуре.

2.2.2. Обработка препаратов биоптатов семенников методом TUNEL

Препараты биоптатов семенников проводили через две смены буферного раствора 1xPBS по 5 минут в каждой при комнатной температуре. Далее пермобилизацию мембран проводили на льду в 0,1%-ном растворе цитрата натрия с 0,1% Triton X100 в течение 15 минут. Далее препараты снова через две смены буферного раствора 1xPBS по 5 минут в каждой при комнатной температуре. Под покровное стекло наносили по 4,5 мкл 1xTdT буфера и 0,5 мкл фермента, накрывали парафильмом и оставляли в термостате при +37°C во влажной камере на 1 час. После этого препараты проводили по 3 сменам буферного

раствора 1xPBS по 5 минут в каждой при комнатной температуре. Для остановки реакции промывали препараты в дистиллированной воде и проводили по спиртам с возрастающей концентрацией (70°, 80°, 96°). Препараты заключали в фотозащитный раствор Vectaschield H-1200, содержащий DAPI.

С помощью флуоресцентного микроскопа LEICA DM 2500, оборудованного объективами FLUOTAR 10x/0.3, 20x/0.50, 63x/0.70 и 100x/1.30-0,60, автоматической фотонасадкой, черно-белой камерой Leica DFC 345 FC и блоком светофильтров для флуорохромов, фотографировали ядра и фиксировали координаты их расположение на препарате для последующего анализа. Для получения изображений использовали программное обеспечение Leica Application Suite V.3.8.0.

2.2.3. Флуоресцентная гибридизация *in situ* на препаратах из биоптатов семенников

Те же препараты биоптатов семенников проводили через серию спиртов с возрастанием концентрации (70°, 80°, 96°) по 3 минуты в каждом, после чего препараты высушивали при комнатной температуре. Затем препараты промывали в 4xSSC (водный раствор 600 mM NaCl и 60 mM цитрата натрия) в водяной бане при 37°C в течение 5 минут. Далее препараты проводили через раствор, содержащий 45 мкл 10% пепсина, 45 мкл 2M HCl и 50 мл дистиллированной H₂O, в водяной бане при 37°C в течение 20 минут. Препараты промывали в растворе 4xSSC в течение 5 минут в водяной бане при 37°C и покачивании. Фиксацию препаратов проводили в стакане с холодным 2,5% водном растворе параформальдегида в течение 10 минут при комнатной температуре. После этого препараты отмывали в двух сменах 4xSSC в водяной бане при 37°C и покачивании по 5 минут в каждой. Препараты споласкивали в дистиллированной воде и проводили по серии спиртов (70°, 80°, 96°) по 3 минуты в каждом. Высушивали препараты при комнатной температуре.

В работе использовались ДНК-зонды, специфичные к центромерным последовательностям хромосом 7, 8 и 11 для определения ploидности клетки. Гибридизационную смесь наносили на целевые зоны препарата в объеме, зависящем от диаметра зоны, и накрывали покровными стеклами диаметром от 6 до 11 мм. Затем края покровных стекол заклеивали резиновым клеем и препараты помещали в гибридизер Thermobright на следующую программу: денатурация при 78°C в течение 10 минут, гибридизация при 37°C в течение 12-18 часов. После завершения программы резиновый клей удаляли с помощью пинцета. Препараты промывали в растворе 4xSSC с Tween (на 50 мл 4xSSC 50 мкл Tween) на водяной бане при 37°C в течение 2 минут для удаления

покровных стекол. Далее препараты отмывали в 2 сменах 4xSSC на водяной бане при 37°C и покачивании по 5 минут в каждой. Затем препараты споласкивали в дистиллированной воде, проводили по серии спиртов (70°, 80°, 96°) по 3 минуты в каждом и высушивали при комнатной температуре.

2.2.4. Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов из биоптатов семенников с помощью антител к 5hmC

С препаратов из биоптатов семенников, предварительно прошедших флуоресцентную гибридизацию *in situ*, смывали покровное стекло дистиллированной водой. На препараты наносили по 100 мкл блокирующего раствора, накрывали покровными стеклами и инкубировали в течение 40 минут во влажной камере в термостате при температуре 37°C. Далее убрали покровные стекла, наносили по 97 мкл блокирующего раствора, содержащего первые антитела к 5hmC в разведении 1:500, и накрывали покровными стеклами. Препараты инкубировали в течение 1 часа 15 минут во влажной камере при комнатной температуре. После этого препараты отмывали в трех сменах 1xPBS, содержащего Tween в отношении 1:250, по 3 минуты в каждой смене на водяной бане с покачиванием. После этого на препараты наносили по 100 мкл блокирующего раствора, содержащего вторые антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa 488, в разведении 1:500, накрывали покровными стеклами и инкубировали в течение 1 часа 15 минут во влажной камере в термостате при 37°C. Затем препараты отмывали в трех сменах 1xPBS, содержащего Tween в отношении 1:250, по 3 минуты в каждой смене на водяной бане с покачиванием. Далее препараты споласкивали сначала в 1xPBS, затем в дистиллированной воде и высушивали на воздухе при комнатной температуре. После этого препараты проводили через серию спиртов (70°, 80°, 96°) по 3 минуты в каждом и высушивали при комнатной температуре. Далее на препараты наносили фотозащитный заключающий раствор Vectaschield H-1200, содержащий DAPI, и накрывали покровными стеклами.

С помощью флуоресцентного микроскопа LEICA DM 2500 находили и фотографировали с помощью программного обеспечения Leica Application Suite V.3.8.0 те же ядра, которые были введены до этого.

2.2.5. Методика приготовления препаратов сперматозоидов из эякулята человека

Образцы эякулята гипотонировали в 0,9% растворе цитрата натрия в течение 30 минут. Далее центрифугировали пробирки с образцами эякулята в течение 15 минут при

1700 об./мин. После чего супернатант сливали и пипетировали осадок до образования однородного раствора. В пробирку с эякулятом добавляли фиксатор (этанол + ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) в объеме 1,5-2 мл и ресуспензировали с помощью пипетки. После чего пробирки ставили в морозилку на 30 минут. Снова центрифугировали пробирки в течение 15 минут при 1700 об./мин, сливали супернатант и добавляли 2 мл фиксатор с последующим ресуспензированием. Затем ставили пробирки в морозилку на 30 минут. Далее центрифугировали пробирки в течение 15 минут при 1700 об./мин и сливали супернатант. Осадок разбавляли фиксатором до нужной концентрации и суспензировали до однородности раствора. Наносили около 0,1 мл суспензии на чистые стекла под наклоном. Затем высушивали стекла при комнатной температуре.

2.2.6. Обработка препаратов эякулята методом TUNEL

Препараты эякулятов проводили через две смены буферного раствора 1xPBS по 5 минут в каждой при комнатной температуре. Далее дополнительно фиксировали препараты в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 10 минут. Пермобилизацию мембран проводили на льду в 0,1%-ном растворе цитрата натрия с 0,1% Triton X100 в течение 15 минут. Далее препараты снова через две смены буферного раствора 1xPBS по 5 минут в каждой при комнатной температуре. Под покровное стекло наносили по 4,5 мкл 1xTdT буфера и 0,5 мкл фермента, накрывали парафильмом и в термостате при +37°C во влажной камере на 1 час. После этого препараты проводили по 3 сменам буферного раствора 1xPBS по 5 минут в каждой при комнатной температуре. Для остановки реакции промывали препараты в дистиллированной воде и проводили по спиртам с возрастающей концентрацией (70°, 80°, 96°). Препараты заключали в фотозащитный раствор Vectaschield H-1200, содержащий DAPI.

С помощью флуоресцентного микроскопа LEICA DM 2500 фотографировали сператозоиды и фиксировали координаты их расположение на препарате для последующего анализа. Для получения изображений использовали программное обеспечение Leica Application SuiteV.3.8.0.

2.2.7. Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов из эякулятов с помощью антител к 5hmC

Препараты из эякулята дегидратировали в серии спиртов (70°, 80°, 96°) по 3 минуты в каждом и высушивали. Далее препараты денатурировали в 2М HCl в течение 25 минут при комнатной температуре. После этого препараты отмывали в 3 сменах 1xPBS

при температуре -20°C по 3 минуты в каждой в 3 сменах 1xPBS при комнатной температуре по 3 минуты в каждой.

На препараты наносили по 100 мкл блокирующего раствора, накрывали покровными стеклами и инкубировали в течение 40 минут во влажной камере в термостате при температуре 37°C . Далее сбрасывали покровные стекла, наносили по 97 мкл блокирующего раствора, содержащего первые антитела к 5hmC в разведении 1:500, и накрывали покровными стеклами. Препараты инкубировали в течение 1 часа 15 минут во влажной камере при комнатной температуре. После этого препараты отмывали в трех сменах 1xPBS, содержащего Tween в отношении 1:250, по 3 минуты в каждой смене на водяной бане с покачиванием. После этого на препараты наносили по 100 мкл блокирующего раствора, содержащего вторые антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa 488, в разведении 1:500, накрывали покровными стеклами и инкубировали в течение 1 часа 15 минут во влажной камере в термостате при 37°C . Затем препараты отмывали в трех сменах 1xPBS, содержащего Tween в отношении 1:250, по 3 минуты в каждой смене на водяной бане с покачиванием. Далее препараты споласкивали сначала в 1xPBS, затем в дистиллированной воде и высушивали на воздухе при комнатной температуре. После этого препараты проводили через серию спиртов (70° , 80° , 96°) по 3 минуты в каждом и высушивали при комнатной температуре. Далее на препараты наносили фотозащитный заключающий раствор Vectaschield H-1200, содержащий DAPI, и накрывали покровными стеклами.

С помощью флуоресцентного микроскопа LEICA DM 2500 находили и фотографировали с помощью программного обеспечение Leica Application Suite V.3.8.0 те же сперматозоиды, которые были введены до этого.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Анализ взаимосвязи фрагментации и гидроксиметилирования ДНК в ядрах клеток сперматогенного ряда человека

Был проведен анализ соотношения ядер клеток сперматогенного ряда, полученных из биоптатов семенников 7 пациентов с азооспермией, с 5hmC и фрагментированной ДНК. Причиной отсутствия сперматозоидов в семенной жидкости могут быть нарушения процессов сперматогенеза, что приводит к необструктивной азооспермии, или непроходимость в семявыносящих каналах, что приводит к обструктивной азооспермии.

В клетках сперматогенного ряда семенников проходит апоптоз, результат которого можно зарегистрировать методом TUNEL, который выявляет разрывы в ДНК. Анализ содержания фрагментированной ДНК в ядрах клеток сперматогенного ряда проводили визуально после обработки препаратов методом TUNEL. О наличии или отсутствии в клетке фрагментированной ДНК судили по наличию флуоресцентного сигнала. Ранее установлено, что в клетках сперматогенного ряда семенников может проходить запрограммированное активное деметилирование с образованием 5-гидроксиметилцитозина (Efimova et al., 2017). Было показано, что 5hmC выявляется преимущественно в сперматогониях типа А. Анализ содержания 5hmC в ядрах клеток сперматогенного ряда, а также их ploидности проводили визуально после иммунофлуоресцентного окрашивания со специфическими антителами к 5hmC и флуоресцентной гибридизации *in situ* последовательно на одних и тех же препаратах. О наличии или отсутствии 5hmC в ядрах клеток сперматогенного ряда судили по наличию флуоресцентного сигнала. Pлоидность клетки определяли по числу специфических флуоресцентных сигналов (Рис. 4).

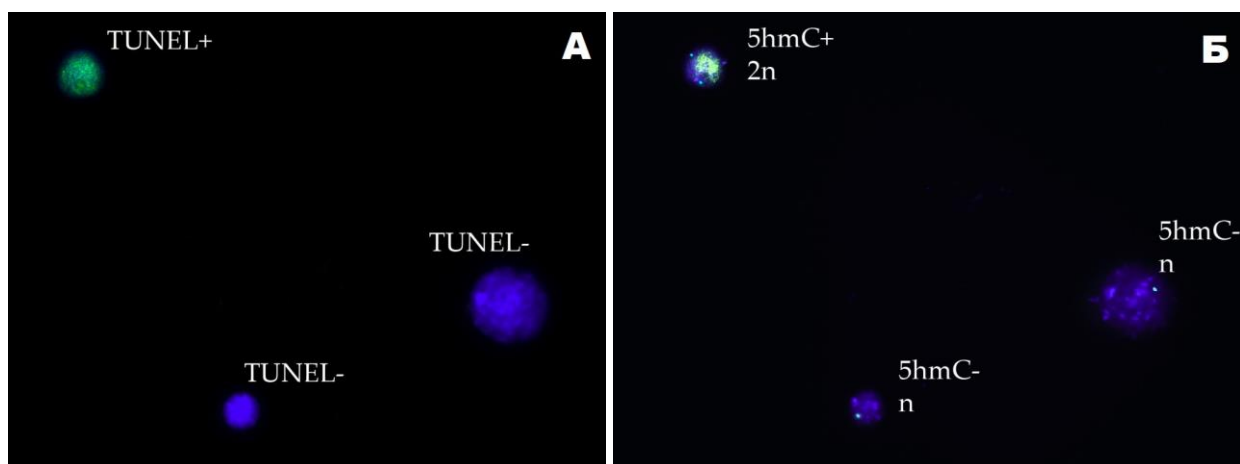


Рис. 4. Ядра клеток сперматогенного ряда из биоптатов семенников пациента с азооспермией после обработки препаратов методом TUNEL (А) и после проведения гибридизации *in situ* с ДНК-зондами, специфичными к центромерному району хромосомы 8, и иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью специфических антител к 5hmC (Б).

В результате последовательного проведения на одних и тех же препаратах TUNEL, флуоресцентной гибридизации *in situ* и иммунофлуоресцентного окрашивания были охарактеризованы восемь групп ядер клеток сперматогенного ряда, отличающихся по плоидности, наличию фрагментированной ДНК и содержанию 5hmC. Анализ диплоидных и гаплоидных ядер проводили отдельно. На первом этапе работы определяли содержание фрагментированной ДНК и 5hmC в диплоидных ядрах, а на втором - в гаплоидных.

Примерно в половине диплоидных клеток из биоптатов семи пациентов не было выявлено ни фрагментированной ДНК, ни 5hmC. Второй по численности являлась группа клеток, содержащая только 5hmC. Процент таких ядер варьировал от 32% до 50%. От 1% до 10% ядер содержали фрагментированную ДНК и не содержали 5hmC. В отдельных ядрах была выявлена как фрагментированная ДНК, так и 5-гидроксиметилцитозин. Процент таких ядер варьировал от 1% и до 7% (Рис. 5).

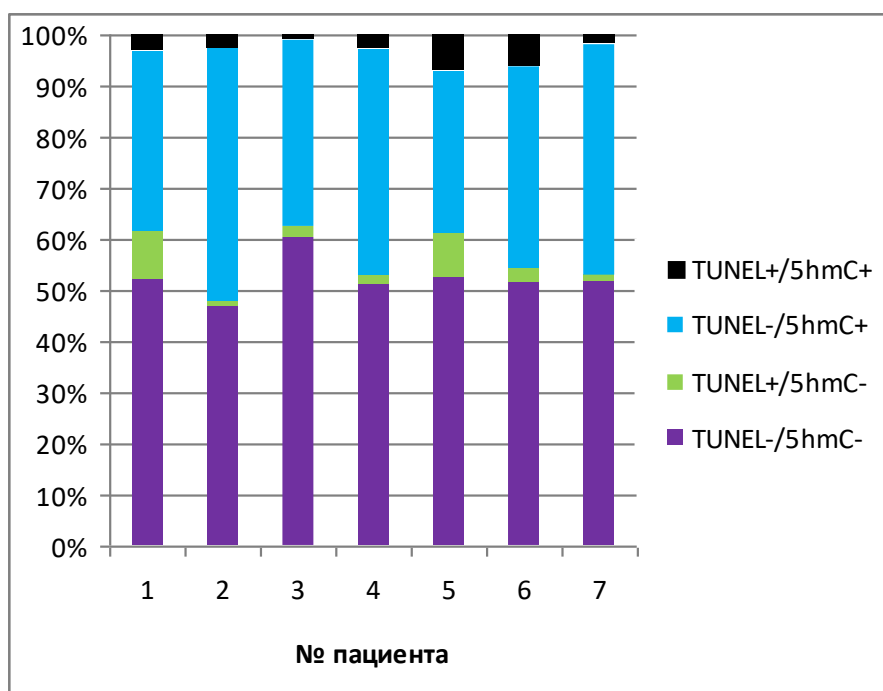


Рис. 5. Соотношение диплоидных ядер в биоптате семенников 7 пациентов с фрагментированной ДНК (TUNEL+), с 5hmC (5-hmC+), а также как с 5hmC, так и с фрагментированной ДНК (TUNEL+/5-hmC+).

Для проверки предположения о том, что процессы происходят независимо друг от друга был применен критерий хи-квадрат для сравнения абсолютного числа клеток, содержащих как фрагментированную ДНК, так и 5-гидроксиметилцитозин, и их теоритически ожидаемое число (Таблица 1). Этот подход был применен для того, чтобы понять, случайно ли происходят процессы фрагментации ДНК и гидроксиметилирования в одних и тех же клетках, или же оба процесса взаимосвязаны. Результаты анализа позволили установить, что у 6 пациентов фактически полученное число диплоидных ядер, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, статистически не отличалось от теоретически ожидаемого. Это, наиболее вероятно, свидетельствует о том, что оба процесса проходят независимо друг от друга и случайно совпадают в небольшом проценте клеток. Однако у 1 пациента с необструктивной азооспермией фактически полученное число ядер, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, статистически отличалось от теоретически ожидаемого. Число таких ядер было меньше, чем ожидалось увидеть при независимости процессов. Не исключено, что у этого пациента при апоптозе элиминируется часть клеток, наиболее вероятно сперматогонии типа А, в которых может одновременно проходить и тот, и другой процесс. Процессы, определяющие это состояние, пока неизвестны и требуют последующего изучения.

Таблица 1. Число диплоидных ядер клеток из биоптатов семенников 7 пациентов, содержащих фрагментированную ДНК, 5hmC и как 5hmC, так и фрагментированную ДНК. Показано теоретически ожидаемое число ядер, содержащих оба маркера, при условии, что оба процесса идут независимо друг от друга.

Н – необструктивная, О – обструктивная.

№ пациента	Тип азооспермии	Число ядер	Число ядер, содержащих TUNEL+/5hmC-	Число ядер, содержащих TUNEL-/5hmC+	Число ядер, содержащих TUNEL+/5hmC+	Теоретически ожидаемое число ядер, содержащих TUNEL+/5hmC+ в случае независимости процессов	χ^2	Вероятность
1	Н	979	95	345	28	47	6.98 *	p<0,05
2	?	833	8	413	20	15	2.24	p>0,05
3	Н	409	8	150	3	4	0.26	p>0,05
4	О	486	8	216	13	10	0.93	p>0,05
5	О	341	30	108	24	21	0.38	p>0,05
6	О	325	9	128	20	13	3.28	p>0,05
7	О	388	4	177	6	5	0.33	p>0,05

Таким образом, в диплоидных клетках сперматогенного ряда, как правило, процессы активного деметилирования и фрагментации ДНК проходят независимо друг от друга и совпадают случайным образом в небольшом проценте клеток.

Вторым этапом работы был анализ содержания фрагментированной ДНК и 5hmC в гаплоидных ядрах клеток сперматогенного ряда.

В большинстве гаплоидных ядер в биоптатах семи пациентов не было выявлено ни фрагментированной ДНК, ни 5hmC. Доля клеток, содержащих только 5hmC, варьировала от 6% до 27%. От 1% до 20% ядер содержали фрагментированную ДНК и не содержали 5hmC. В биоптате клеток семенников также была группа ядер, как фрагментированную ДНК, так и 5-гидроксиметилцитозин. Процент этих ядер в эякулятах разных пациентов варьировал от 1% до 4% (Рис. 6).

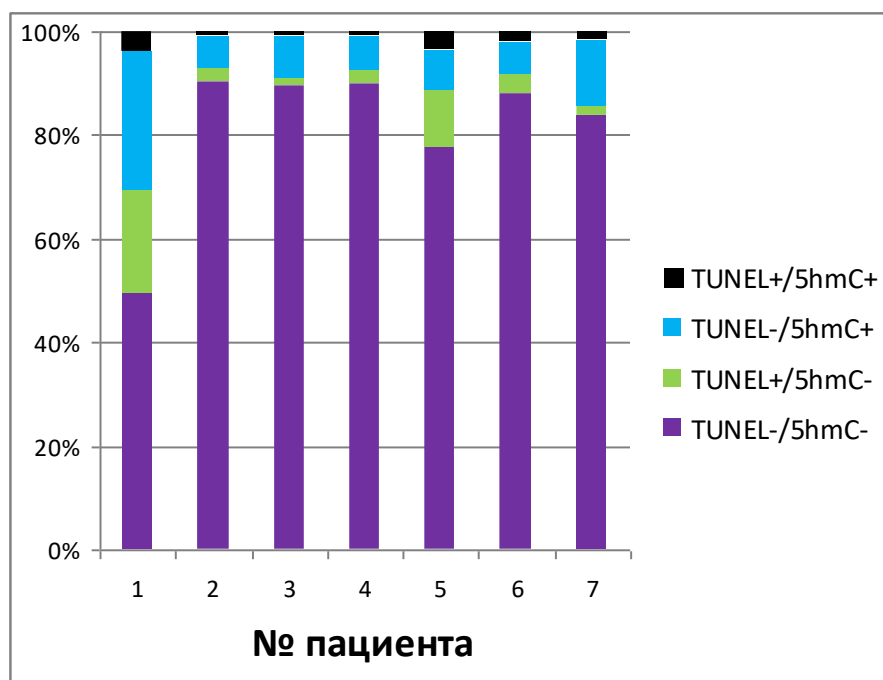


Рис. 6. Соотношение гаплоидных ядер в биоптате семенников 7 пациентов с фрагментированной ДНК, с 5hmC, а также как с 5hmC, так и с фрагментированной ДНК.

Результаты сравнительного анализа позволили установить, что у 6 пациентов фактически полученное число диплоидных ядер, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, статистически не отличалось от теоретически ожидаемого (Табл. 2). Это, наиболее вероятно, свидетельствует о том, что оба процесса проходят независимо друг от друга и, как в диплоидных клетках, случайно совпадают в небольшом проценте клеток. Однако у 1 пациента фактически полученное число ядер, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, статистически отличалось от теоретически ожидаемого. Число таких ядер было больше, чем ожидалось увидеть при независимости процессов фрагментации и гидроксиметилирования ДНК. Таким образом, лишь у данного пациента в сперматиде оба процесса преимущественно протекают одновременно в одних и тех же клетках.

Таблица 2. Число гаплоидных ядер в биоптате семенников 7 пациентов, содержащих только фрагментированную ДНК, только 5hmC и содержащих и то, и другое. Показано теоретически ожидаемое число ядер, содержащих оба маркера, при условии, что оба процесса идут независимо друг от друга.

Н – необструктивная, О – обструктивная.

№ пациента	Тип азооспермии	Число ядер	Число ядер, содержащих TUNEL+/ 5hmC-	Число ядер, содержащих TUNEL-/ 5hmC+	Число ядер, содержащих TUNEL+/ 5hmC+	Теоретическое и ожидаемое число ядер, содержащих TUNEL+/ 5hmC+ в случае независимости процессов	χ^2	Вероятность
1	Н	361	72	96	14	26	5,25	p>0,05
2	?	1072	28	64	10	3	5,32	p>0,05
3	Н	449	6	36	4	1	2,65	p>0,05
4	О	530	14	34	4	1	1,66	p>0,05
5	О	437	48	33	15	7	4,17	p>0,05
6	О	628	24	39	13	3	8,54*	p<0,05
7	О	372	7	48	5	2	2,26	p>0,05

Таким образом, в гаплоидных клетках сперматогенного ряда, как правило, процессы активного деметилирования и фрагментации ДНК проходят независимо друг от друга и совпадают случайным образом в небольшом проценте клеток.

3.2. Анализ взаимосвязи фрагментации и гидроксиметилирования ДНК в эякулированных сперматозоидах

Были проанализированы одни и те же ядра сперматозоидов из эякулятов 8 пациентов с нарушениями фертильности, при этом оценивали одновременное присутствие как фрагментированной ДНК, так и 5hmC.

Стадия созревания сперматозоидов является крайне уязвимой к действиям факторов внешней среды. Одним из основных негативных факторов является избыточное количество АФК. АФК способны вызывать разрывы в ДНК, что приводит к ее фрагментации. Оценку содержания фрагментированной ДНК в сперматозоидах производили визуально после обработки препаратов методом TUNEL. О наличии в сперматозоидах фрагментированной ДНК судили по наличию флуоресцентного сигнала. Также АФК участвуют в окислении 5-метилцитозина до 5-гидроксиметилцитозина. Оценку содержания 5hmC в сперматозоидах проводили также визуально после иммунофлуоресцентного окрашивания со специфическими антителами к 5hmC на тех же препаратах. О наличии 5hmC в сперматозоидах судили по наличию флуоресцентного сигнала (Рис. 7).

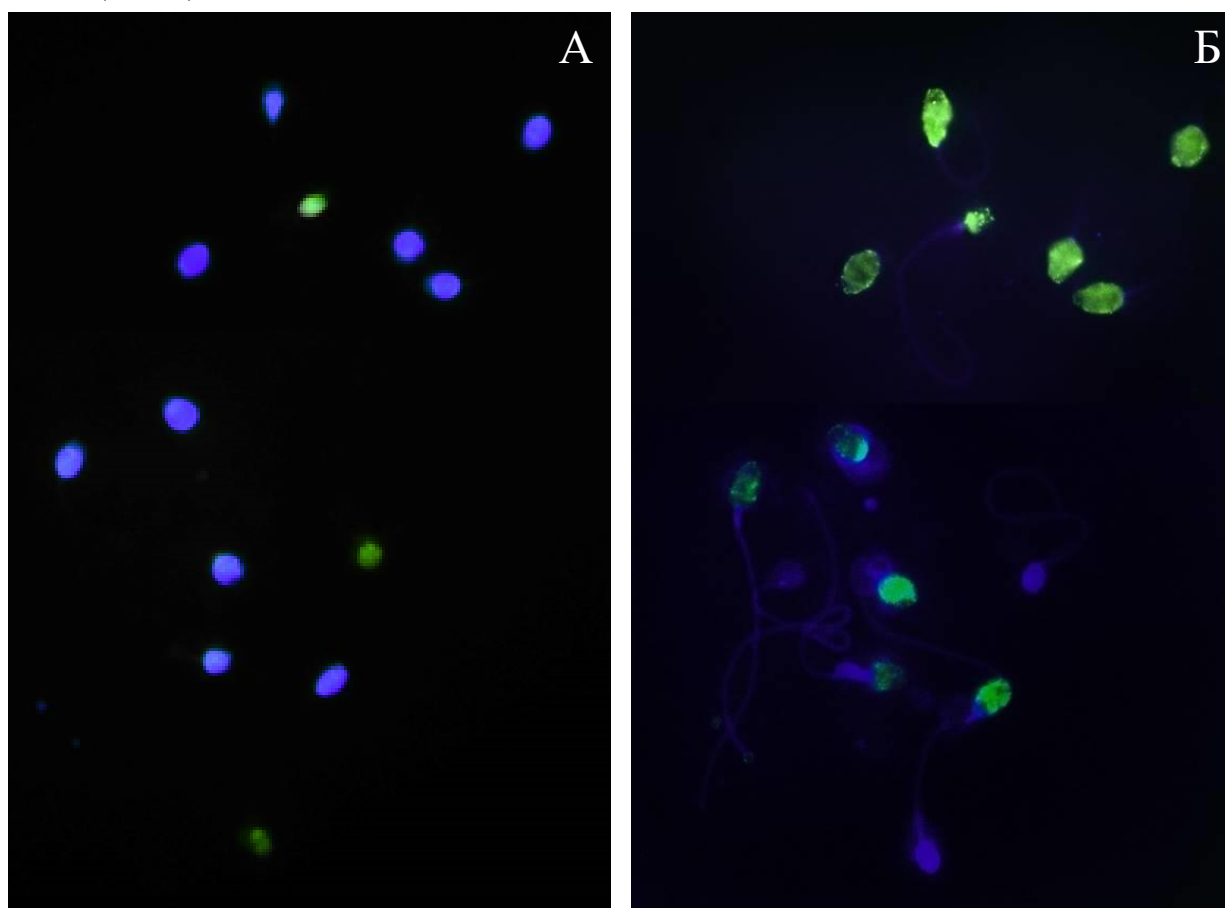


Рис. 7. Сперматозоиды из эякулята пациента с нарушением фертильности, окрашенные методом TUNEL (А) и с помощью антител к 5hmC (Б).

В результате последовательного окрашивания одних и тех же препаратов методом TUNEL и с помощью специфических антител к 5hmC были выявлены четыре группы сперматозоидов, отличающиеся по содержанию фрагментированной ДНК и 5hmC.

Большая часть сперматозоидов (от 75% до 94%) эякулятов 8 пациентов не содержала ни фрагментированную ДНК, ни 5hmC. Сперматозоиды, содержащие только 5hmC, составляли от 1% до 10%. От 1% до 8% сперматозоидов содержали фрагментированную ДНК, но не содержали 5hmC. Доля сперматозоидов, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, варьировала от 2% до 16% (Рис. 8).

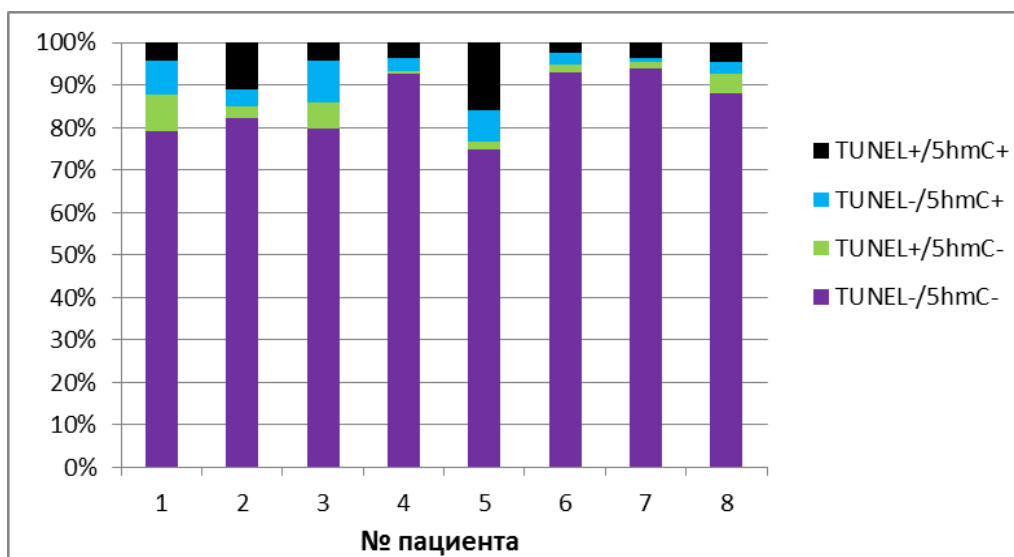


Рис. 8. Соотношение сперматозоидов в эякулятах 8 пациентов с фрагментированной ДНК (TUNEL+), с 5hmC (5-hmC+), а также как с 5hmC, так и с фрагментированной ДНК (TUNEL+/5-hmC+).

Для проверки предположения о том, что процессы происходят фрагментации и гидроксиметилирования ДНК проходят независимо друг от друга был применен критерий хи-квадрат для сравнения абсолютного числа сперматозоидов, содержащих как фрагментированную ДНК, так и 5-гидроксиметилцитозин и их теоретически ожидаемое число. Результаты сравнительного анализа позволили установить, что у всех пациентов фактически полученное число сперматозоидов, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, статистически отличалось от теоретически ожидаемого (Табл. 3). Число таких сперматозоидов было больше, чем ожидалось увидеть при независимости процессов. Это, наиболее вероятно, свидетельствует о том, что оба процесса зависят друг от друга и проходят, преимущественно, в одних и тех же клетках.

Таблица 3. Число сперматозоидов в эякуляте 8 пациентов, содержащих только фрагментированную ДНК, только 5hmC и содержащих и то, и другое. Показано теоретически ожидаемое число сперматозоидов, содержащих оба маркера, при условии, что оба процесса идут независимо друг от друга.

№ пациента	Число ядер	Число ядер, содержащих TUNEL+/ 5hmC-	Число ядер, содержащих TUNEL-/ 5hmC+	Число ядер, содержащих TUNEL+/ 5hmC+	Теоретически ожидаемое число ядер, содержащих TUNEL+/ 5hmC+ в случае независимости процессов	χ^2	Вероятность
1	609	51	50	25	9	10,44*	p>0,05
2	1297	97	52	143	27	195,56*	p>0,05
3	2730	167	264	118	40	58,60*	p>0,05
4	2219	14	71	79	6	130,21*	p>0,05
5	1818	33	139	287	75	350,14*	p>0,05
6	1229	21	33	30	3	38,76*	p>0,05
7	1100	16	8	41	3	77,38*	p>0,05
8	1077	48	33	47	7	51,86*	p>0,05

Следует учитывать, что во время созревания в эпидидимусе сперматозоиды теряют большую часть цитоплазмы, что делает клетку уязвимой для воздействия негативных факторов внешней среды. Основным негативным фактором, вызывающим нарушения сперматогенеза у мужчин, являются АФК. АФК несут один неспаренный электрон и обладают высокой окислительной способностью. К основным АФК относят пероксид-радикал, гидроксил-радикал, супероксид-анион и перекись водорода. Высокий уровень АФК, характерный для окислительного стресса, приводит как к фрагментации ДНК, так и запускает окисление 5-метилцитозина до 5-гидроксиметилцитозина. Повреждения ДНК или изменения характера гидроксиметилирования генома сперматозоидов может стать причиной нарушений в ходе дробления зиготы или даже остановки развития эмбриона.

Основной терапией, направленной на снижение количества АФК, является прием антиоксидантов. Прием антиоксидантов пациентами, страдающими от бесплодия, повышает вероятность репродуктивного успеха (Comhaire et al., 2000). Показано, что прием антиоксидантов снижает уровень фрагментированной ДНК в сперматозоидах. Однако, еще нет данных о том, снижается ли уровень гидроксиметилирования ДНК, что, безусловно, требует дальнейшего изучения.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют том, что АФК являются общим триггером, как процесса фрагментации, так и гидроксиметилирования ДНК. Именно поэтому в тех сперматозоидах, которые подвергаются атаке АФК, одновременно спонтанно запускаются процессы как фрагментации ДНК, так и гидроксиметилирования ДНК.

3.3. Сопоставление доли сперматозоидов, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, и параметров спермограммы

В настоящее время для оценки качества сперматозоидов используют анализ параметров спермограммы. К параметрам спермограммы относят концентрацию сперматозоидов в эякуляте, их подвижность и морфологию. Наличие в сперматозоиде фрагментированной ДНК и 5hmC может негативно повлиять на развитие зародыша. Поэтому является крайне важным поиск корреляции между параметрами спермограммы, различимыми визуально, и доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК и 5hmC.

Для анализа взаимосвязи доли сперматозоидов, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, с такими параметрами спермограммы как подвижность и морфология головки использовали вычисление корреляции по Спирмену.

Корреляция не была обнаружена между долей сперматозоидов, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, и такими параметрами спермограммы, как доля сперматозоидов с нормальной морфологией ($r=-0.19$, $p=0.6$) и доля прогрессивно-подвижных сперматозоидов ($r=-0.08$, $p=0.8$). Также не была обнаружена корреляция между долей сперматозоидов, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, и такими параметрами спермограммы, как доля неподвижных сперматозоидов ($r=0.43$, $p=0.2$), доля сперматозоидов с аномальной головкой ($r=0.09$, $p=0.8$), доля сперматозоидов с аномальной шейкой ($r=-0.28$, $p=0.5$) и доля сперматозоидов с аномальным хвостом ($r=0.55$, $p=0.2$).

Однако наблюдалась тенденция в сторону положительной связи между долей сперматозоидов, содержащих и фрагментированную ДНК, и 5hmC, и неподвижных сперматозоидов (Рис. 9). Возможно, статистически достоверная корреляция отсутствовала в данном случае ввиду малой выборки.

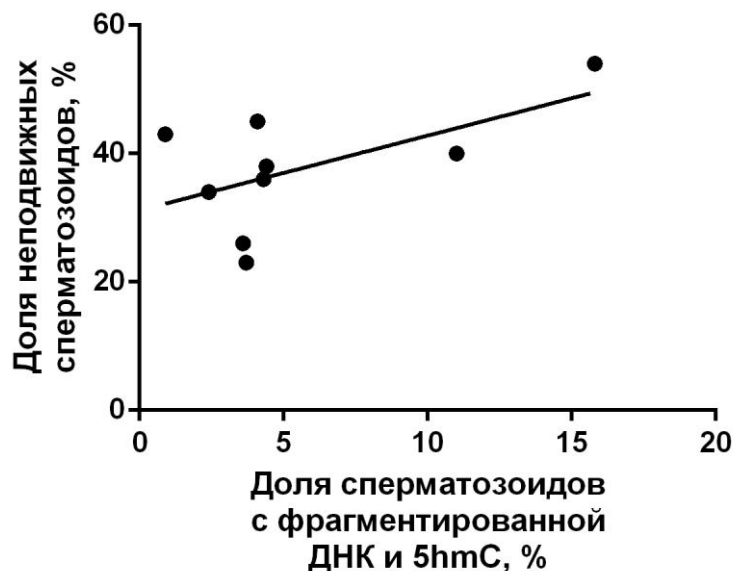


Рис. 9. Взаимосвязь доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК и 5hmC и доли неподвижных сперматозоидов у пациентов с нарушением фертильности. Коэффициент корреляции Спирмена $r=0.43$ и Р-значение $p=0.2$.

Таким образом, чем выше у пациентов доля сперматозоидов, содержащих фрагментированную ДНК и 5hmC, тем, возможно, больше вероятность выявить у них неподвижные сперматозоиды. Однако, для утверждения данного положения необходимо увеличение выборки пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексный подход с использованием методов TUNEL, иммуноцитохимического окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ* позволил изучить взаимосвязь процессов фрагментации и гидроксиметилирования ДНК в клетках сперматогенного ряда пациентов с нарушениями фертильности. Установлено, что на стадии сперматогониев и сперматид процессы фрагментации и гидроксиметилирования ДНК преимущественно проходят независимо друг от друга и случайным образом совпадают в отдельных клетках. В эякулированных сперматозоидах у пациентов с нарушениями фертильности, напротив, процессы фрагментации и гидроксиметилирования ДНК взаимосвязаны и, вероятно, вызваны общим триггером.

ВЫВОДЫ

1. На стадии сперматогонием и сперматид процессы фрагментации и гидроксиметилирования ДНК преимущественно протекают независимо.
2. В сперматозоидах из эякулята пациентов с нарушениями фертильности процессы гидроксиметилирования и фрагментации ДНК взаимозависимы и, вероятно, вызваны одним триггером.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aarabi, M., San Gabriel, M. C., Chan, D., Behan, N. A., Caron, M., Pastinen, T., ... & Trasler, J. (2015). High-dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism. *Human molecular genetics*, 24(22), 6301-6313.
2. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 37.
3. Aitken, J., & Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16(4), 259-267.
4. Amann, R. P. (2008). The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?. *Journal of andrology*, 29(5), 469-487.
5. Aramaki, S., Hayashi, K., Kurimoto, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Iwanari, H., ... & Saitou, M. (2013). A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Developmental cell*, 27(5), 516-529.
6. Bestor, T. H., Edwards, J. R., & Boulard, M. (2015). Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 6796-6799.
7. Bian, Q., Xu, L. C., Wang, S. L., Xia, Y. K., Tan, L. F., Chen, J. F., ... & Wang, X. R. (2004). Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occupational and environmental medicine*, 61(12), 999-1005.
8. Biermann, K., & Steger, K. (2007). Epigenetics in male germ cells. *Journal of andrology*, 28(4), 466-480.
9. Blaschke, K., Ebata, K. T., Karimi, M. M., Zepeda-Martínez, J. A., Goyal, P., Mahapatra, S., ... & Lorincz, M. C. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 500(7461), 222.
10. Bourc'his, D., Xu, G. L., Lin, C. S., Bollman, B., & Bestor, T. H. (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, 294(5551), 2536-2539.
11. Bourc'his, D., & Bestor, T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 431(7004), 96.
12. Cai, H., Zheng, W., Zheng, P., Wang, S., Tan, H., He, G., & Qu, W. (2015). Human urinary/seminal phthalates or their metabolite levels and semen quality: A meta-analysis. *Environmental research*, 142, 486-494.

13. Campolo, F., Gori, M., Favaro, R., Nicolis, S., Pellegrini, M., Botti, F., ... & Dolci, S. (2013). Essential role of Sox2 for the establishment and maintenance of the germ cell line. *Stem Cells*, 31(7), 1408-1421.
14. Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., ... & Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450(7173), 1230.
15. Chang, H., & Matzuk, M. M. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mechanisms of development*, 104(1), 61-67.
16. Chavarro, J. E., Toth, T. L., Wright, D. L., Meeker, J. D., & Hauser, R. (2010). Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertility and sterility*, 93(7), 2222-2231.
17. Chazaud, C., & Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development*, 143(7), 1063-1074.
18. Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, 64(1), 16-64.
19. Chu, G. C., Dunn, N. R., Anderson, D. C., Oxburgh, L., & Robertson, E. J. (2004). Differential requirements for Smad4 in TGF β -dependent patterning of the early mouse embryo. *Development*, 131(15), 3501-3512.
20. Clermont, Y. (1966). Renewal of spermatogonia in man. *Developmental Dynamics*, 118(2), 509-524.
21. Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Developmental Dynamics*, 112(1), 35-51.
22. Comhaire, F. H., Christophe, A. B., Zalata, A. A., Dhooge, W. S., Mahmoud, A. M. A., & Depuydt, C. E. (2000). The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 63(3), 159-165.
23. Crider, K. S., Yang, T. P., Berry, R. J., & Bailey, L. B. (2012). Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Advances in nutrition*, 3(1), 21-38.
24. Dada, R., Kumar, M., Jesudasan, R., Fernández, J. L., Gosálvez, J., & Agarwal, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(3), 213-223.

25. Dai, R. L., Hou, Y., Li, F. B., Yue, J. M., Xi, Q., & Liu, R. Z. (2015). Varicocele and male infertility in Northeast China: Y chromosome microdeletion as an underlying cause. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 6583-6590.
26. de Angelis, C., Galdiero, M., Pivonello, C., Salzano, C., Gianfrilli, D., Piscitelli, P., ... & Pivonello, R. (2017). The Environment and Male Reproduction: the Effect of Cadmium Exposure on Reproductive System and Semen Quality and its Implication in Fertility. *Reproductive Toxicology*.
27. de Paula, T. S., Bertolla, R. P., Spaine, D. M., Cunha, M. A., Schor, N., & Cedenho, A. P. (2006). Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility*, 86(3), 597-600.
28. de Sousa Filho, E. P., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., Glina, S., & Bianco, B. (2018). Y chromosome microdeletions and varicocele as aetiological factors of male infertility: A cross-sectional study. *Andrologia*, 50(3).
29. Eckersley-Maslin, M. A., Alda-Catalinas, C., & Reik, W. (2018). Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1.
30. Edwards, J. R., Yarychkivska, O., Boulard, M., & Bestor, T. H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & chromatin*, 10(1), 23.
31. Efimova, O. A., Pendina, A. A., Tikhonov, A. V., Parfenyev, S. E., Mekina, I. D., Komarova, E. M., ... & Krapivin, M. I. (2017). Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality. *Oncotarget*, 8(51), 88294.
32. Evenson, D. P., & Wixon, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2), 532-537.
33. Frydman, N., Prisant, N., Hesters, L., Frydman, R., Tachdjian, G., Cohen-Bacrie, P., & Fanchin, R. (2008). Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertility and sterility*, 89(1), 92-97.
34. Garolla, A., Torino, M., Sartini, B., Cosci, I., Patassini, C., Carraro, U., & Foresta, C. (2013). Seminal and molecular evidence that sauna exposure affects human spermatogenesis. *Human Reproduction*, 28(4), 877-885.

35. Gershoni, M., Hauser, R., Yogev, L., Lehavi, O., Azem, F., Yavetz, H., ... & Kleiman, S. E. (2017). A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genetics in Medicine*, 19(9), 998.
36. Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C. L., Zhang, X., ... & Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311(5759), 395-398.
37. Gu, T. P., Guo, F., Yang, H., Wu, H. P., Xu, G. F., Liu, W., ... & Iqbal, K. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477(7366), 606.
38. Guilleret, I., Yan, P., Grange, F., Braunschweig, R., Bosman, F. T., & Benhattar, J. (2002). Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *International journal of cancer*, 101(4), 335-341.
39. Hackett, J. A., & Surani, M. A. (2013). DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 368(1609), 20110328.
40. He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., ... & Sun, Y. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333(6047), 1303-1307.
41. Heidari, M. M., Khatami, M., Danafar, A., Dianat, T., Farahmand, G., & Talebi, A. R. (2016). Mitochondrial genetic variation in Iranian infertile men with varicocele. *International journal of fertility & sterility*, 10(3), 303.
42. Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., ... & Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), 1300-1303.
43. Jenardhanan, P., Panneerselvam, M., & Mathur, P. P. (2016, November). Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 59, pp. 126-140). Academic Press.
44. Jiang, L. G., Cheng, L. Y., Kong, S. H., Yang, Y., Shen, Y. J., Chen, C., ... & Chao, L. (2017). Toxic effects of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) on human sperm motility. *Asian journal of andrology*, 19(5), 561.
45. Johnson, L., Petty, C. S., & NEAVES, W. B. (1986). Age-related Variation in Seminiferous Tubules in Men A Stereologic Evaluation. *Journal of andrology*, 7(5), 316-322.

46. Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., & Saitou, M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *The EMBO journal*, 32(3), 340-353.
47. Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., ... & Tomilin, A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO reports*, 5(11), 1078-1083.
48. Khoueiry, R., Sohni, A., Thienpont, B., Luo, X., Velde, J. V., Bartocchetti, M., ... & Koh, K. P. (2017). Lineage-specific functions of TET1 in the postimplantation mouse embryo. *Nature genetics*, 49(7), 1061.
49. Kumar, D. L., & DeFalco, T. (2017, March). Of mice and men: in vivo and in vitro studies of primordial germ cell specification. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 35, No. 2, p. 139). NIH Public Access.
50. Lambrot, R., Xu, C., Saint-Phar, S., Chountalos, G., Cohen, T., Paquet, M., ... & Kimmins, S. (2013). Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nature communications*, 4, 2889.
51. Lee, H. J., Hore, T. A., & Reik, W. (2014). Reprogramming the methylome: erasing memory and creating diversity. *Cell stem cell*, 14(6), 710-719.
52. Li, L., Lu, X., & Dean, J. (2013). The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular aspects of medicine*, 34(5), 919-938.
53. Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., ... & Edsall, L. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *nature*, 462(7271), 315.
54. Marques, C. J., João Pinho, M., Carvalho, F., Bièche, I., Barros, A., & Sousa, M. (2011). DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics*, 6(11), 1354-1361.
55. McLay, D. W., & Clarke, H. J. (2003). Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*, 125(5), 625-633.
56. Mima, M., Greenwald, D., & Ohlander, S. (2018). Environmental Toxins and Male Fertility. *Current urology reports*, 19(7), 50.
57. Miyamoto, T., Minase, G., Shin, T., Ueda, H., Okada, H., & Sengoku, K. (2017). Human male infertility and its genetic causes. *Reproductive medicine and biology*.
58. Mou, L., Wang, Y., Li, H., Huang, Y., Jiang, T., Huang, W., ... & Jiang, Z. (2013). A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. *Human genetics*, 132(2), 159-165.

59. Nakagawa, A., Shiratsuchi, A., Tsuda, K., & Nakanishi, Y. (2005). In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Molecular reproduction and development*, 71(2), 166-177.
60. Nakao, M. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, 278(1), 25-31.
61. Nimura, K., Ishida, C., Koriyama, H., Hata, K., Yamanaka, S., Li, E., ... & Kaneda, Y. (2006). Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. *Genes to Cells*, 11(10), 1225-1237.
62. Oda, M., Oxley, D., Dean, W., & Reik, W. (2013). Regulation of lineage specific DNA hypomethylation in mouse trophectoderm. *PLoS One*, 8(6), e68846.
63. Oh, E., Lee, E., Im, H., Kang, H. S., Jung, W. W., Won, N. H., ... & Sul, D. (2005). Evaluation of immuno-and reproductive toxicities and association between immunotoxicological and genotoxicological parameters in waste incineration workers. *Toxicology*, 210(1), 65-80.
64. Ohinata, Y., Payer, B., O'carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., ... & Saitou, M. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 436(7048), 207.
65. Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., & Saitou, M. (2009). A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*, 137(3), 571-584.
66. Ohno, R., Nakayama, M., Naruse, C., Okashita, N., Takano, O., Tachibana, M., ... & Seki, Y. (2013). A replication-dependent passive mechanism modulates DNA demethylation in mouse primordial germ cells. *Development*, 140(14), 2892-2903.
67. Oko, R., & Sutovsky, P. (2009). Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *Journal of reproductive immunology*, 83(1-2), 2-7.
68. Ooi, S. K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., ... & Cheng, X. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, 448(7154), 714.
69. Pasqualotto, F. F., & Pasqualotto, E. B. (2011). Aging and Sperm DNA Damage. In *Sperm Chromatin* (pp. 337-349). Springer, New York, NY.
70. Patat, O., Pagin, A., Siegfried, A., Mitchell, V., Chassaing, N., Faguer, S., ... & Marcelli, F. (2016). Truncating mutations in the adhesion G protein-coupled receptor G2 gene

ADGRG2 cause an X-linked congenital bilateral absence of vas deferens. *The American Journal of Human Genetics*, 99(2), 437-442.

71. Pathak, P., Chandrashekar, A., Hakky, T. S., & Pastuszak, A. W. (2016). Varicocele management in the era of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Asian journal of andrology*, 18(3), 343.
72. Paul, C., Murray, A. A., Spears, N., & Saunders, P. T. (2008). A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*, 136(1), 73-84.
73. Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., ... & Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 463(7284), 1101.
74. Qiu, L. L., Wang, X., Zhang, X. H., Zhang, Z., Gu, J., Liu, L., ... & Wang, S. L. (2013). Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A. *Toxicology letters*, 219(2), 116-124.
75. Rana, S. V. S. (2014). Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals—a review. *Biological trace element research*, 160(1), 1-14.
76. Richards, R., Patel, J., Stevenson, K., & Harbison, S. (2018). Evaluation of massively parallel sequencing for forensic DNA methylation profiling. *Electrophoresis*.
77. Rubes, J., Lowe, X., Moore, D., Perreault, S., Slott, V., Evenson, D., ... & Wyrobek, A. J. (1998). Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men 18. *Fertility and sterility*, 70(4), 715-723.
78. Russell, L. D., Ren, H. P., Hikim, I. S., Schulze, W., & Hikim, A. P. S. (1990). A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Developmental Dynamics*, 188(1), 21-30.
79. Saleh, R. A., & HCLD, A. A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 23(6), 737-752.
80. Seah, M. K., & Messerschmidt, D. M. (2017). From Germline to Soma: Epigenetic Dynamics in the Mouse Preimplantation Embryo.
81. Sharma, R., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. In *Sperm Chromatin* (pp. 19-44). Springer, New York, NY.
82. Singh, N. P., Muller, C. H., & Berger, R. E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and sterility*, 80(6), 1420-1430.

83. Slotter, E., Nath, J., Eskenazi, B., & Wyrobek, A. J. (2004). Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertility and sterility*, 81(4), 925-943.
84. Smallwood, S. A., & Kelsey, G. (2012). De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends in Genetics*, 28(1), 33-42.
85. Song, J., Rechkoblit, O., Bestor, T. H., & Patel, D. J. (2011). Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science*, 331(6020), 1036-1040.
86. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., ... & Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), 930-935.
87. Tang, W. W., Kobayashi, T., Irie, N., Dietmann, S., & Surani, M. A. (2016). Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nature Reviews Genetics*, 17(10), 585.
88. Tremblay, K. D., Dunn, N. R., & Robertson, E. J. (2001). Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development*, 128(18), 3609-3621.
89. Tüttelmann, F., Werny, F., Cooper, T. G., Kliesch, S., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2011). Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy. *International journal of andrology*, 34(4pt1), 291-298.
90. Tüttelmann, F., Ruckert, C., & Röpke, A. (2018). Disorders of spermatogenesis. *medizinische genetik*, 30(1), 12-20.
91. Utsumi, S., Sato, K., & Ichikawa, S. (2018). Insight into the Recognition Mechanism of DNA Cytosine-5 Methyltransferases (DNMTs) by Incorporation of Acyclic 5-Fluorocytosine (F C) Nucleosides into DNA. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*.
92. Wang, L., Zhang, J., Duan, J., Gao, X., Zhu, W., Lu, X., ... & Li, W. (2014). Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell*, 157(4), 979-991.
93. Wang, Y. X., Zeng, Q., Sun, Y., You, L., Wang, P., Li, M., ... & Li, S. (2016). Phthalate exposure in association with serum hormone levels, sperm DNA damage and spermatozoa apoptosis: A cross-sectional study in China. *Environmental research*, 150, 557-565.
94. Wisniewski, P., Romano, R. M., Kizys, M. M., Oliveira, K. C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., ... & Romano, M. A. (2015). Adult exposure to bisphenol A (BPA) in

Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology*, 329, 1-9.

95. Wu, T. P., Wang, T., Seetin, M. G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., ... & Tackett, A. (2016). DNA methylation on N 6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 532(7599), 329.
96. Xia, Y., Cheng, S., Bian, Q., Xu, L., Collins, M. D., Chang, H. C., ... & Wang, X. (2004). Genotoxic effects on spermatozoa of carbaryl-exposed workers. *Toxicological Sciences*, 85(1), 615-623.
97. Yang, F., Silber, S., Leu, N. A., Oates, R. D., Marszalek, J. D., Skaletsky, H., ... & Wang, P. J. (2015). TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO molecular medicine*, 7(9), 1198-1210.
98. Yatsenko, A. N., Georgiadis, A. P., Röpke, A., Berman, A. J., Jaffe, T., Olszewska, M., ... & Yatsenko, S. A. (2015). X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *New England Journal of Medicine*, 372(22), 2097-2107.